
Bedeutung der Interaktion von Optineurin mit dem Adenovirus E3-14.7K Protein für die TNFR1-Signalkaskade

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG
DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



vorgelegt von
Laura Klingseisen
aus München

im Jahr 2011

Promotionsgesuch eingereicht am: 21. April 2011

Die Arbeit wurde angeleitet von: PD. Dr. Wulf Schneider

Laura Klingseisen

Prüfungsausschuss:

Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. Armin Kurtz

Prüfer: Prof. Dr. Thomas Langmann
Prof. Dr. Wulf Schneider
Prof. Dr. Warth

Per aspera ad astra
(Seneca)

Meinen Eltern und meiner Schwester Anna

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1. Einleitung.....	3
1.1 Die Apoptose	3
1.1.1 Geschichtlicher Hintergrund der Apoptose und ihre Bedeutung in der Physiologie.....	3
1.1.2 Die Rolle der Caspasen als Initiatoren und Effektoren der Apoptose	5
1.1.3 Der intrinsische Apoptoseweg – die Beteiligung der Mitochondrien	6
1.1.4 Der extrinsische Apoptoseweg - Signalwege über Todesrezeptoren.....	7
1.2 TNF und die TNFR1-Signalkaskade	9
1.2.1 Apoptotische Signalkaskade des TNFR1	10
1.2.2 Die NF κ B-Signalkaskade	12
1.2.3 Aktivierung der MAP-Kinasen p38, JNK und Erk	15
1.3 Virale Mechanismen zur Abwehr der Apoptose	17
1.4 Proteine der adenoviralen E3-Region und ihre Interaktion mit Immunregulatoren	19
1.5 Beteiligung von E3-14.7K an NFκB-Signalweg und TNFR1-Internalisierung	20
1.6 Optineurin	23
Zielsetzung	26
2. Material und Methoden	27
2.1 Molekularbiologie	27
2.1.1 Klonierung der 14.7K Konstrukte	28
2.1.2 Klonierung der Optineurin Konstrukte	28
2.2 Zellbiologie.....	28
2.2.1 Zelllinien und Kultivierung	28
2.2.2 Transfektion von Plasmiden	28
2.2.3 Transfektion von siRNA.....	29
2.2.4 Zelllysate	30
2.2.5 Immunpräzipitation	30
2.2.6 Retroviraler Gentransfer: Herstellung stabil exprimierender Zelllinien	31
2.2.7 Zytotoxizitätsassay	32
2.2.8 Isolierung magnetisch markierter Vesikel.....	33
2.2.9 Mammalian Two- Hybrid Assay.....	34
2.2.10 Biotin-TNF Internalisierungsassay	36
2.2.11 Fluorimetrische Bestimmung der Caspase-8-Aktivität	36
2.2.12 Fluoreszenzmikroskopische Analysen	38
2.3 Proteinbiochemie	40
2.3.1 Protein-Expression in <i>E. coli</i>	40

2.3.2	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	40
2.3.3	Aufreinigung von His-Fusionsproteinen	41
2.3.4	Proteinfractionierung mittels Prep Cell	41
2.3.5	Bestimmung der Proteinkonzentration	41
2.3.6	SDS-PAGE	41
2.3.6	Western-Blot-Analyse.....	42
3.	Ergebnisse.....	44
3.1	Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen 14.7K	44
3.1.1	Aufreinigung von GST-14.7K und His-14.7K.....	44
3.1.2	Nachweis von 14.7K durch den Antikörper anti-14.7K in Western Blot, Immunpräzipitation und Immunfluoreszenz.....	48
3.2	Analyse der Interaktion von 14.7K-Mutanten mit Optineurin	50
3.2.2	Mammalian Two-Hybrid Assay.....	51
3.2.3	Co-Immunpräzipitation	52
3.3	Analyse der anti-apoptotischen Funktion ausgewählter 14.7K-Mutanten	54
3.3.1	Stabile Expression der 14.7K-Varianten in H1299- und KB-Zellen	54
3.3.2	Zytotoxizitätsassay	55
3.3.3	Fluorimetrische Analyse der Caspase-8-Aktivierung	57
3.3.4	Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Zellkerne nach TNF-Stimulation	60
3.4	Suppression der endogenen Optineurin-Expression durch siRNA	63
3.4.1	Kontrolle der Wirkungsdauer von Optineurin-siRNA in parental H1299-Zellen.....	63
3.4.2	Analyse der anti-apoptotischen Funktion der protektiven 14.7K-Varianten nach Optineurin-Suppression.....	64
3.4.3	Analyse der TNFR1-Internalisierung in siRNA-Optineurin transfizierten Zellen.....	66
3.5	Untersuchung der Optineurin-Rekrutierung an den TNFR1 anhand magnetisch isolierter TNFR1-Komplexe	67
3.6	Analyse des NFκB-Signalweges und Aktivierung von MAP-Kinasen nach TNF- Stimulation in 14.7K-exprimierenden Zellen	70
4.	Diskussion.....	75
4.1	Die Proteinstruktur von 14.7K	76
4.1.1	Zusammenhang von Proteinstruktur und Interaktion mit Optineurin	77
4.1.2	Zusammenhang von Proteinstruktur und TNF-Resistenz	78
4.2	Korrelation von Zytotoxizitätsassay und Caspase-8-Aktivität.....	79
4.3	Beteiligung von Optineurin und 14.7K an zellulären Prozessen	80
4.3.1	Interaktion von 14.7K und Optineurin bei der Endocytose und vesikulären Transportprozessen	81
4.3.2	Die Funktion von Optineurin in apoptotischen Prozessen.....	82
4.3.3	Rekrutierung von 14.7K und Optineurin an den TNFR1	85
4.3.4	Hemmung von Optineurin als negativen Regulator des NFκB-Signals durch 14.7K	86

4.3.5 Zusammenfassung Optineurin-abhängiger und –unabhängiger Funktionen von 14.7K .	88
4.4 Die Verbindung von E3-Promotor und den MAPK-Signalwegen	89
4.5 Zusammenspiel von 14.7K mit zellulären Proteinen	90
4.6 Ausblick.....	91
5. Anhang.....	92
5.1 Abkürzungen.....	92
5.2 DNA-Konstrukte.....	94
5.2.1 Oligonukleotide.....	94
5.2.2 Sequenzen der siRNA-Optineurin	94
5.2.3 Plasmide.....	95
Literaturverzeichnis	97
Danksagung	101

Zusammenfassung

TNF ist ein pleiotropes Zytokin, dessen vielfältige biologische Funktionen hauptsächlich über den TNFR1 vermittelt werden. Dieser wird aufgrund seiner konstitutiven Verbreitung auf nahezu allen Zelltypen und Geweben als Hauptmediator des TNF-Signals angesehen. Über ihn können drei Signalkaskaden in der Zelle aktiviert werden: 1) Apoptose, 2) NF κ B-Signalweg und 3) MAPK-Signalwege. Während die Aktivierung von NF κ B und der MAPK-Signalkaskaden von der Internalisierung des Rezeptors unabhängig ist, ist diese für die Einleitung der Apoptose essentiell (Schütze et al. 1999). Dabei werden die Adapterproteine TRADD, FADD und Caspase-8, die zusammen den DISC (*death inducing signaling complex*) bilden, an die cytoplasmatische Todesdomäne des Rezeptors rekrutiert, was zur Aktivierung der Initiator-Caspase-8 und nachfolgender Effektor-Caspasen führt (Schneider et al. 2004). Durch die Expression des Adenovirus E3-14.7K Proteins (kurz 14.7K) können Zellen vor der TNF-induzierten Apoptose geschützt werden. Schneider et al. fanden heraus, dass in Anwesenheit von 14.7K sowohl die Internalisierung des Rezeptors als auch die Rekrutierung des DISC gehemmt ist (Schneider et al. 2006). 14.7K selbst konnte aber keine Interaktion mit dem TNFR1 nachgewiesen werden, weshalb die Möglichkeit in Betracht gezogen wurde, dass die anti-apoptotische Wirkung durch zelluläre Interaktionspartner vermittelt werden könnte. Durch einen *yeast two hybrid screen* wurden vier zelluläre Interaktionspartner von 14.7K identifiziert, darunter Optineurin (Horwitz 2004). Da Optineurin selbst TNF-induziert an den TNFR1 rekrutiert werden kann (Zhu et al. 2007) und über weitere Interaktionspartner in endo- und exocytotische Vesikeltransportprozesse involviert ist (Sahlender et al. 2005), schien es ein möglicher Kandidat zur Vermittlung der 14.7K-bedingten TNF-Resistenz zu sein. Optineurin ist zudem an der Regulation des Transkriptionsfaktors NF κ B beteiligt, der unter anderem die Expression anti-apoptotischer Proteine in Gang setzt. Die Bedeutung der Interaktion von 14.7K mit Optineurin für die TNFR1-Signalkaskade wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Als Hilfsmittel zur Untersuchung 14.7K-assoziiierter Prozesse wurde dazu zunächst ein polyklonaler Antikörper gegen 14.7K hergestellt, der das Protein sowohl in Western Blot, Immunpräzipitation und Immunfluoreszenz detektiert. Mit Hilfe eines Mammalian Two-Hybrid Assay und einer Co-Immunpräzipitation wurde die Interaktionsfähigkeit verschiedener 14.7K-Mutanten mit Optineurin untersucht. In einem nachfolgenden Zytotoxizitätsassay zur Überprüfung des Zusammenhangs zwischen der Interaktionsfähigkeit mit Optineurin und der protektiven Eigenschaft der 14.7K-Mutanten konnte keine Korrelation festgestellt werden. Zudem konnten auch Zellen, in denen die Expression von Optineurin durch siRNA unterdrückt wurde, durch 14.7K vor TNF-induzierter Apoptose geschützt werden. Nachdem in Optineurin-supprimierten Zellen außerdem durch einen TNFR1-Internalisierungsassay gezeigt werden konnte, dass die Blockade der TNFR1-Internalisierung durch 14.7K von der Expression von Optineurin unabhängig ist,

schließen diese Ergebnisse insgesamt eine Beteiligung von Optineurin an der Ausprägung des anti-apoptotischen Effekts durch 14.7K aus. Um herauszufinden, ob die TNF-abhängige Rekrutierung von Optineurin an den TNFR1 durch die Expression von 14.7K beeinflusst wird, wurden magnetisch markierte TNFR1-Proteinkomplexe aus 14.7K-exprimierenden Zellen isoliert. Die Analyse dieser Proteinkomplexe ergab, dass Optineurin auch in Anwesenheit von 14.7K an den Rezeptor gelangt. Interessanterweise konnte dabei auch 14.7K selbst in Assoziation mit dem TNFR1-Komplex detektiert werden, wobei Optineurin als Adapterprotein in Frage kommen könnte. Da sowohl die Aktivierung von NF κ B und die der MAPK-Signalkaskaden p38, JNK und Erk über den TNFR1 vermittelt werden können und Optineurin regulatorisch in die Aktivierung von NF κ B involviert ist, wurde überprüft, ob diese durch die Expression von 14.7K beeinträchtigt wird. Beide Signalwege zeigten jedoch in ihrer Signaltransduktion keine Veränderung durch die Anwesenheit von 14.7K.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der 14.7K-vermittelte Schutz vor TNF-induzierter Apoptose von der Interaktion mit Optineurin unabhängig ist. Weiterhin stellte sich heraus, dass 14.7K an den TNFR1-Proteinkomplex rekrutiert wird, wobei Optineurin als Adapterprotein dienen könnte. Die Aktivierung von NF κ B und der MAP-Kinasen p38, JNK und Erk wird durch die Expression von 14.7K nicht beeinflusst.

1. Einleitung

1.1 Die Apoptose

1.1.1 Geschichtlicher Hintergrund der Apoptose und ihre Bedeutung in der Physiologie

Die gezielte Forschung an zellulären Degenerationsprozessen begann in der Mitte des 19. Jahrhunderts. Mit der Entwicklung des Mikroskops wuchs das Verständnis von Zellen als biologische Bausteine eines Organismus und schon frühe Studien beschrieben Proliferation und Regression von Zellen während der Ontogenese. Der deutsch-schweizerische Naturwissenschaftler Carl Vogt berichtete 1842 bei Forschungen an der Entwicklung von Kaulquappen der Gemeinen Geburtshelferkröte erstmals von einem natürlich auftretenden Zelltod (Clarke and Clarke 1995; Clarke and Clarke 1996). Dieser Prozess wurde fast ein halbes Jahrhundert später von Walther Flemming im Jahre 1885 als „Chromatolyse“ beschrieben (Flemming 1885). Dies war die erste Anerkennung des Zelltods als physiologische Funktion. Die Beteiligung chemischer Veränderungen innerhalb der Zellen schloss Flemming dabei nicht aus. Bis Ende des 19. Jahrhunderts war der Begriff der Chromatolyse als Synonym für diese besondere Form des Zelltodes allgemein akzeptiert. Der deutsche Anatom Ludwig Gräper fasste Flemmings Erkenntnisse 1914 in „Eine neue Anschauung über physiologische Zellausschaltung“ zusammen (Gräper 1914). Nach seiner Auffassung war die Chromatolyse als ausgleichendes Gegengewicht zur Zellteilung in Gewebeverbänden und Organen zu verstehen, womit er schon damals die Bedeutung des Zelltods für die Erhaltung der Gewebemöostase herausstellte. Nach Studien am Insektenmodell prägten R. Lockshin und C. Williams in den frühen 1960er Jahren den Begriff des „programmierten Zelltods“ als einen räumlich und zeitlich vorhersehbaren Vorgang (Lockshin and Williams 1964).

Schließlich formulierte der australische Pathologe John Kerr 1971 einen Prozess, den er „*shrinkage necrosis*“ nannte. Er beschrieb dabei Zellen, die im Absterbeprozess nicht platzten wie es sonst oft beobachtet wurde, sondern im Gegenteil kleiner wurden. Im Jahr darauf führte er zusammen mit A. Wyllie und A. Currie dafür die Bezeichnung „Apoptose“ ein (Kerr et al. 1972). Das Wort stammt aus dem Griechischen und bedeutet frei übersetzt das „Herabfallen der Blätter im Herbst“ (apo: von, weg; ptosis: herabfallen, sinken). Es beschreibt im übertragenen Sinne den Kreislauf von Leben und Sterben in der Natur. Morphologische Charakteristika der Apoptose sind außer dem Schrumpfen der Zellen zudem die Auflösung von Zellkontakten, Kondensation und Fragmentation des Zellkerns und des Chromatins, Bildung von Ausstülpungen und Blasenbildung der Zellmembran (*membrane blebbing*) und die Bildung sog. apoptotischer Körperchen. Es kommt zum Verlust der Membran-Asymmetrie und damit zur Exposition von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche (Martin et al. 1995). Durch Untersuchungen des Nematoden *Caenorhabditis elegans* konnte 1982 durch R. Horvitz der Zusammenhang zwischen Zelltod und genetischer

Programmierung hergestellt werden (Horvitz et al. 1982). Robert Horvitz und seine Kollegen Sydney Brenner und John E. Sulston bekamen dafür im Jahre 2002 den Nobelpreis für Medizin. Nach der Einführung des Apoptose-Begriffs durch Kerr wurde zunächst nur zwischen den durch äußere oder innere Stimuli bedingten Zelltodformen unterschieden. Der durch externe Stimuli verursachte und passiv ablaufende Zelltod wurde als „Nekrose“ (griechisch nekros: Leichnam) bezeichnet, während der Apoptose Charakteristika der intrinsischen, aktiv durchgeführten Zelldegradation zugeschrieben wurden. Diese beiden Formen des Zelltods wurden auf alle Zelluntergangsphänomene angewendet (Wyllie et al. 1980; Kerr et al. 1994). Daraus ergab sich das sog. „Klassische Zelltodmodell“ (Majno and Joris 1995).

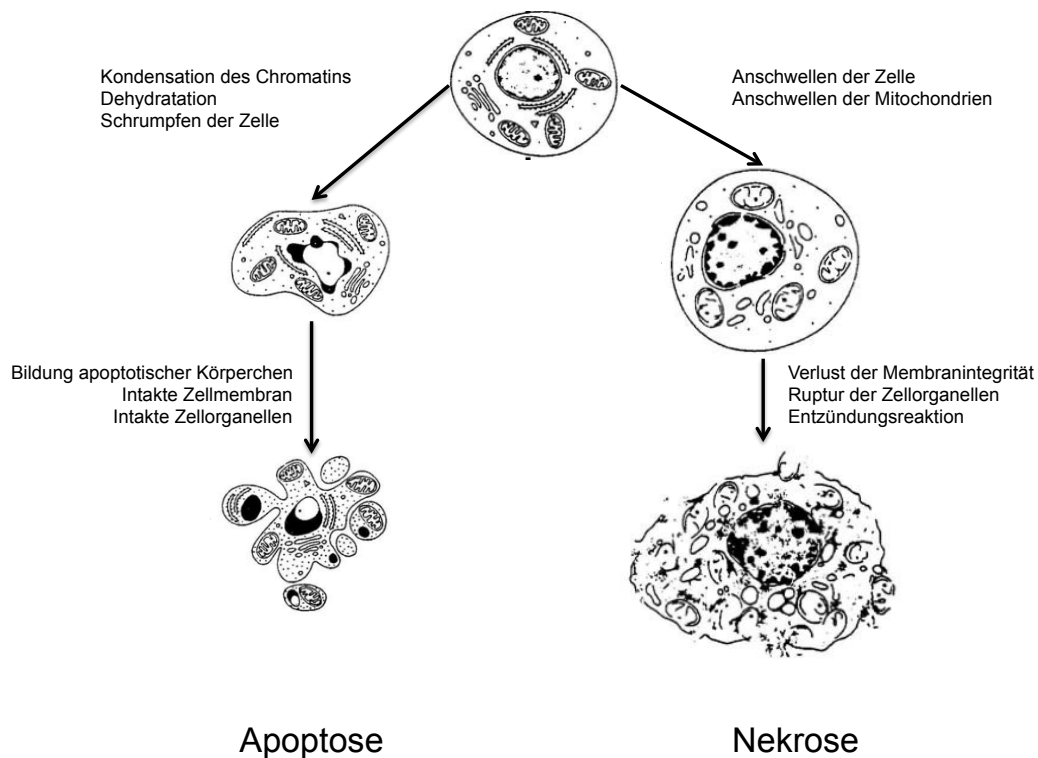


Abb. 1.1 Klassisches Zelltodmodell (verändert nach Manjo 1995)

Die Unterscheidung der beiden Zelltodarten durch die genannten Merkmale ist allerdings nicht immer passend. Morphologisch eindeutig als Nekrose oder Apoptose klassifizierte Prozesse zeigen nach biochemischer Untersuchung Abweichungen. So kann z.B. auch bei nekrotischen Vorgängen spezifische DNA-Fragmentierung beobachtet werden, was bislang als Merkmal der Apoptose galt (Collins et al. 1992; Stewart 1994). Zudem gibt es weitere Formen des regulierten Zelltods, welche oftmals sowohl nekrotische als auch apoptotische Charakteristika beinhalten. Dazu gehören die Autophagozytose, Paraptose, Nekroptose und Onkose (Fadeel and Orrenius 2005).

Die immunologische Bedeutung der Apoptose wird bei der negativen Selektion von B- und T-Zellen im Thymus deutlich. Um den Organismus vor Autoimmunität zu schützen, werden Zellen, die körpereigene Epitope erkennen, durch Apoptose beseitigt (Jacobson et al. 1997). Die Aktivierung des apoptotischen Programms ist außerdem für die Eliminierung von Zellen wichtig, die vom Organismus als krankhaft erkannt werden (Krammer 2000). Dazu gehören unter anderem Tumorzellen, Zellen mit geschädigter DNA oder virusinfizierte Zellen. Aus dem falschen Auftreten oder Fehlen der Apoptose können sich allerdings verschiedene Krankheitsbilder entwickeln. Degenerative Krankheiten wie Alzheimer (Smale et al. 1995; de la Monte et al. 1998) und Parkinson (Anglade et al. 1997; Tatton et al. 1998) sind Folgen eines vermehrten apoptotischen Zelltods im zentralen Nervensystem, die Entstehung von Tumoren kann auf der Proliferation von entarteten Zellen gründen, welche gegenüber pro-apoptotischen Signalen resistent geworden sind (Fulda and Debatin 2004; Gerl and Vaux 2005).

1.1.2 Die Rolle der Caspasen als Initiatoren und Effektoren der Apoptose

Caspasen sind zentrale Komponenten zur Umsetzung apoptotischer Stimuli in der Zelle (Shi 2002; Thornberry 1997). Der Terminus „Caspase“ leitet sich von der biochemischen Funktion der Proteine ab, denn es handelt sich um Proteasen, die ein Cystein im katalytischen Zentrum besitzen und ihre Substrate spezifisch nach Aspartatresten schneiden (*cysteine-aspartate specific protease*) (Thornberry 1997). Als evolutionär konservierte Proteine kommen Caspasen und ihre Homologe in einem breiten Spektrum von Arten vor, welches vom Nematoden *C.elegans* (Yuan et al. 1993), über die Fruchtfliege *D.melanogaster* (Kumar and Doumanis 2000) bis zum einzelligen Eukaryoten *S.cerevisiae* (Madeo et al. 2002) reicht.

In Säugetieren konnten bislang 14 Caspasen identifiziert werden, von denen mindestens 7 eine wichtige Rolle im Prozess der Apoptose spielen (Shi 2002; Earnshaw et al. 1999). Da alle Caspasen in den Zellen als katalytisch inaktive Pro-Enzyme (Zymogene) vorliegen, müssen sie zur Einleitung der Apoptose proteolytisch gespalten werden. Dies kann, wie im Falle der Caspase-8, durch autokatalytische Prozesse geschehen, oder durch vorgeschaltete Initiator-Caspasen induziert werden. Die apoptotischen Caspasen können prinzipiell in zwei Kategorien eingeteilt werden, in Initiator-Caspasen und Effektor-Caspasen. Initiator-Caspasen besitzen im Gegensatz zu Effektor-Caspasen eine längere Prodomäne, in der sich funktionelle Protein-Protein-Interaktionsdomänen wie CARD (*caspase recruiting domain*) oder DED (*death effector domain*) befinden. Über diese Domänen werden die Initiator-Caspasen rekrutiert und in hochmolekularen Komplexen aktiviert. Diese Komplexe werden als Reaktion auf bestimmte pro-apoptotische Signale gebildet, die entweder intrinsischen oder extrinsischen Ursprungs sein können.

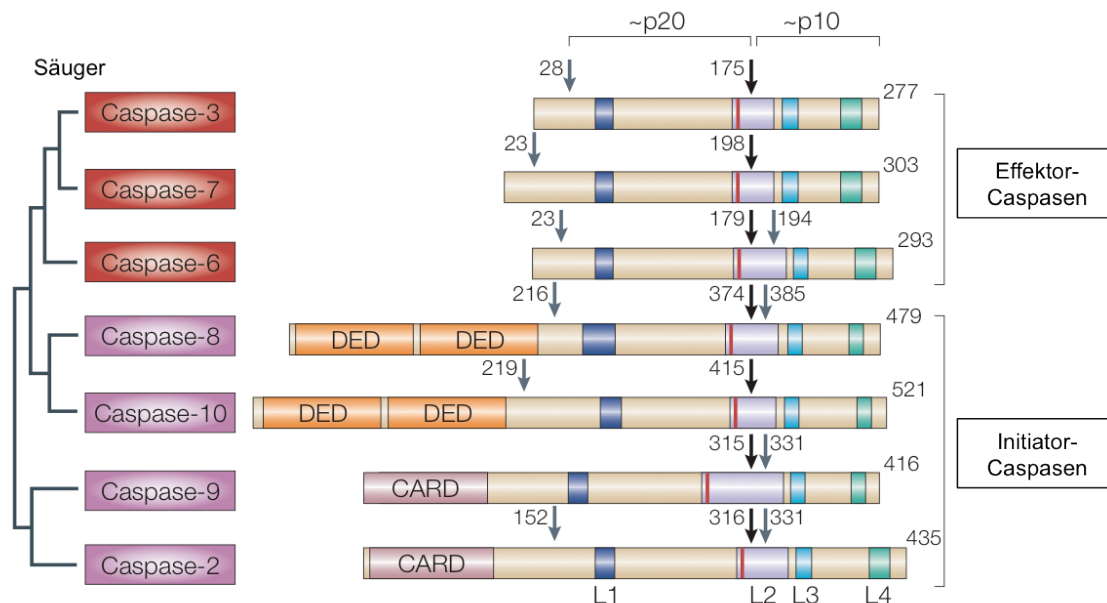


Abb.1.2 Initiator- und Effektor-Caspasen

Schwarze Pfeile: Schnittstelle zwischen großer und kleiner Untereinheit, graue Pfeile: weitere Schnittstellen, L1-4: Oberflächenloop des katalytischen Zentrums, DED: *death effector domain*, CARD: *caspase recruiting Domain*. Verändert nach Riedl und Shi. Review 2004

1.1.3 Der intrinsische Apoptoseweg – die Beteiligung der Mitochondrien

Bei der Aktivierung des intrinsischen Apoptosewegs durch DNA-Schädigung, ionisierende Strahlung oder oxidativen Stress spielen Mitochondrien eine entscheidende Rolle (Wang 2001). Als Reaktion auf einen apoptotischen Stimulus ändert sich ihre Membranpermeabilität und es kommt zur Freisetzung von Cytochrom c aus dem mitochondrialen Lumen ins Zytoplasma (Abb.1.3). Dort bindet es an APAF-1 (*apoptotic protease activating factor 1*) und löst damit in Gegenwart von dATP/ATP die Heptamerisierung des Proteins aus (Liu, Kim, et al. 1996; Li et al. 1997). Anschließend erfolgt die Rekrutierung und proteolytische Aktivierung der Initiator-Caspase-9 über CARD an den Komplex. Die Struktur aus APAF-1, Cytochrom c und Caspase-9 wird als Apoptosom bezeichnet. In definierter Reihenfolge werden nun die Effektor-Caspasen-3, -7 und -6 aktiviert, die zahlreiche pro-apoptotische Proteine als Substrate erkennen, die für die Ausprägung der typischen morphologischen Merkmale der Apoptose verantwortlich sind. Zu diesen Substraten zählen CAD (*caspase activated DNase*) zum Abbau des Chromatins (Enari et al. 1998), sowie Gelsolin, PAK2 (*p21 activated kinase 2*) und Fodrin, welche für den Abbau des Aktinskeletts und das charakteristische „blebbing“ der Zellmembran sorgen (Kothakota et al. 1997; Martin et al. 1995; Rudel 1997). Die mitochondriale Integrität und die Ausschüttung Apoptose-assoziiierter Moleküle steht im Wesentlichen unter der Kontrolle der Bcl-2-Proteine (Zamzami and Kroemer 2001). Die Mitglieder dieser Familie zeichnen sich durch den Besitz von bis zu vier der konservierten Bcl-2-homologen Domänen (BH1 bis BH4) aus, die eine Interaktion der Proteine

ermöglichen (Cory and Adams 2002; Kelekar and Thompson 1998; Reed 1998). Anhand dieser Domänen können pro-apoptotische (Bax, Bad, Bid etc.) und anti-apoptotische (Bcl-2, Bcl-X_L etc.) Vertreter dieser Familie unterschieden werden, da den pro-apoptotisch wirkenden Proteinen die BH4-Domäne fehlt. Nach einem apoptotischen Stimulus kommt es zur Interaktion der an der Außenmembran der Mitochondrien lokalisierten anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine mit den pro-apoptotischen Proteinen, die aus dem Cytoplasma oder anderen Zellorganellen zum Mitochondrium translozieren. Es kommt zur Bildung von Homo- und Heterodimeren aus pro- und anti-apoptotischen Bcl-2-Proteinen, wobei letztlich das Verhältnis über die Freisetzung apoptotischer Faktoren in das Cytoplasma bestimmt (Gross et al. 1999; Chen et al. 2005). Mechanistisch ist noch nicht ausreichend geklärt, wie Bcl-2-Proteine die Permeabilität der Mitochondrienmembran regulieren. Es wird jedoch angenommen, dass dabei die Kontrolle spezieller PT-Poren (*permeability transition*) und der Einfluss auf spannungsabhängige Ionenkanäle (VDAC, *voltage dependent anion channel*, Adenin-Nukleotid-Translokase, Hexokinase) zum Zusammenbruch des Membranpotentials und zu einer Änderung der Ionenleitfähigkeit führen (Brenner and Mak 2009; Chalah and Khosravi-Far 2008).

Außer Cytochrom c werden aus dem mitochondrialen Lumen noch weitere Apoptose-Faktoren freigesetzt, die Caspase-unabhängig für den Prozess der Apoptose wichtig sind. Dazu gehören AIF (*apoptosis inducing factor*) und Endonuklease G, die beide nach Freisetzung in den Zellkern translozieren und dort bei Kondensation und Abbau der DNA mitwirken (Li et al. 2001; Cande 2002).

1.1.4 Der extrinsische Apoptoseweg - Signalwege über Todesrezeptoren

Der extrinsisch aktivierte Apoptoseweg wird über die Rezeptor-Liganden-Interaktion von zellmembranständigen Rezeptoren induziert, die zur sog. TNF-Rezeptor-Superfamilie gehören. Die Rezeptoren dieser Familie lassen sich allgemein in zwei Gruppen einteilen, wobei das entscheidende Kriterium hierfür der Besitz einer Todesdomäne (DD, *death domain*) ist. Zu den sog. Todesrezeptoren gehören TNFR1, CD95/Fas, TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5, DR6, EDAR und NGFR (Aggarwal 2003). Die cytoplasmatische Todesdomäne besteht aus 65-80 Aminosäuren und dient nach der Aktivierung des Rezeptors durch Ligandenbindung als intrazelluläre Plattform für die Bindung diverser Adapterproteine (Wajant et al. 2003), was zur Induktion der Apoptose führt (Ashkenazi and Dixit 1998). Zu den Adapterproteinen gehören FADD (*Fas associated death domain*), Caspase-8 und im Falle von TNFR1 auch TRADD (*TNF-receptor associated death domain*), die zusammen den DISC (*death inducing signaling complex*) bilden (Scaffidi et al. 1999). Die Rekrutierung der Caspase-8 führt zu ihrer autokatalytischen Aktivierung und nachfolgenden Dissoziation aus dem Komplex (Muzio et al. 1996). Durch Caspase-8 kommt es dann zur Aktivierung der Caspase-3-Signalkaskade und Einleitung der Apoptose. Da Caspase-8 auch Bid

aus der Bcl-2-Familie spaltet, kommt es hier zu einer Überschneidung von intrinsisch und extrinsisch motivierter Apoptose, da gespaltenes Bid (tBid, *truncated Bid*) zum Mitochondrium transloziert und dort an der Freisetzung apoptotischer Faktoren beteiligt ist (Luo et al. 1998; Li, Zhu, et al. 1998).

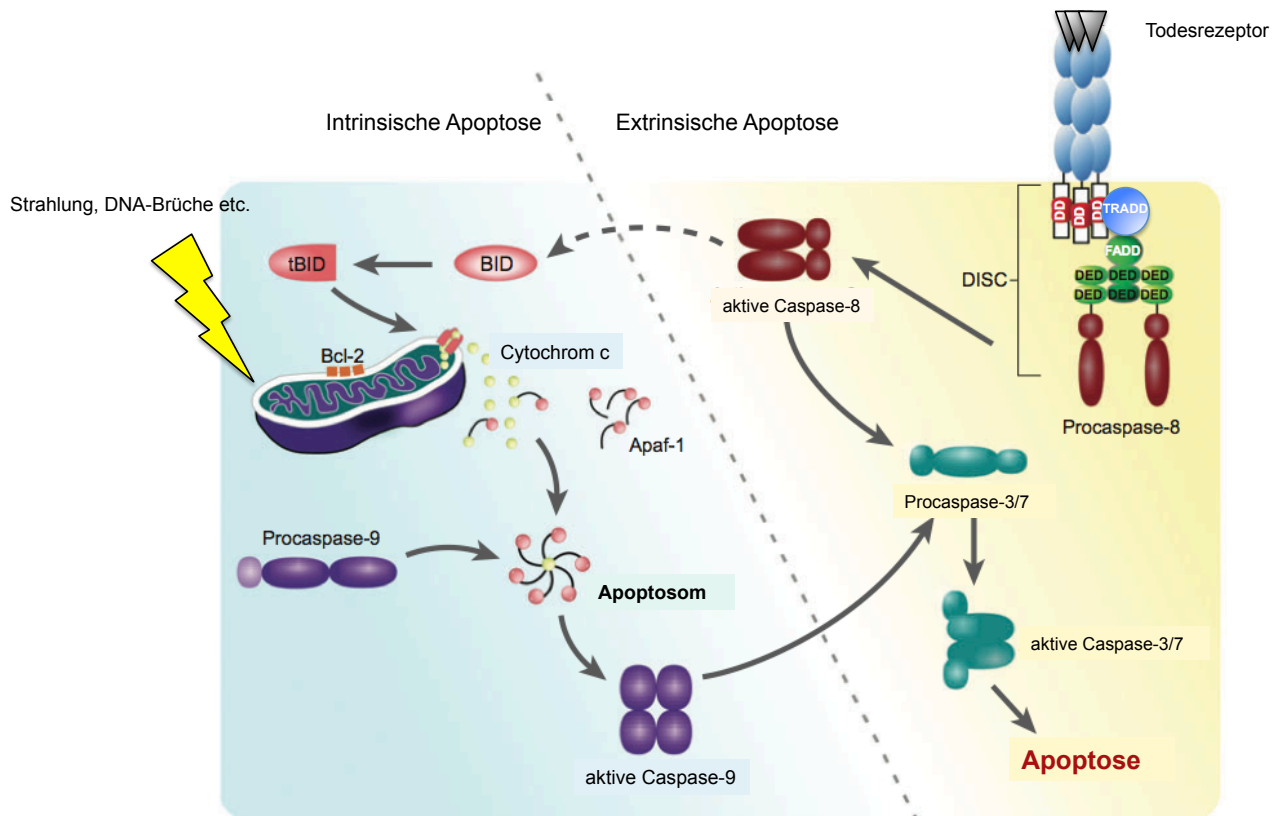


Abb. 1.3 Schematische Darstellung des intrinsischen und extrinsischen Apoptoseweges.

Die Einleitung der intrinsischen Apoptose erfolgt über ionisierende Strahlung, DNA-Brüche oder oxidativen Stress. Als Reaktion darauf verändert sich die Membranpermeabilität der Mitochondrien und es kommt unter Beteiligung pro-apoptotischer Bcl-2-Proteine zur Freisetzung von Cytochrom c. Der aus Cytochrom c, APAF 1 und Pro-Caspase-9 entstehende Komplex wird als Apoptosom bezeichnet und führt zur Aktivierung der Caspase-9, welche wiederum Caspase-3 und -7 aktiviert. Das Signal zur extrinsischen Apoptose wird über Ligand-Rezeptor-Interaktionen mit zellmembranständigen Todesrezeptoren der TNFR-Superfamilie vermittelt. An die Todesdomäne (DD) des aktivierten Rezeptors werden Adapterproteine wie TRADD, FADD und Caspase-8 rekrutiert, die zusammen den DISC (*death inducing signaling complex*) bilden. Im DISC kommt es zur autokatalytischen Aktivierung der Caspase-8 und nachfolgenden Aktivierung der Caspase-Signalkaskade über Caspase-3/-7. Pfeile, die die gestrichelte Trennlinie überschreiten machen die Überschneidung der beiden Apoptosewege deutlich. Verändert nach Best et al., 2008.

1.2 TNF und die TNFR1-Signalkaskade

Die Geschichte der Entdeckung von TNF beginnt bereits im Jahre 1888 als der deutsche Chirurg Paul von Bruns über die vollständige Rückbildung eines Sarkoms nach spontanem oder künstlich herbeigeführtem Erysipel, einer bakterielle Infektion der oberen Hautschichten, bei seinen Patienten berichtete (Bruns 1888). Inspiriert davon injizierte der amerikanische Arzt W.B. Coley einem Krebspatienten Erysipel-verursachende Bakterien vom Stamm *Streptococcus pyogenes* wiederholt direkt in den Tumor und konnte beobachten, wie sich dieser zurückbildete (Coley 1891; Levine 2008). Später verwendete Coley eine Mischung aus abgetöteten Bakterien der Arten *Streptococcus pyogenes* und *Serratia marcescens*, die er „Coley's Toxin“ nannte und erzielte mit dieser Behandlung die beachtliche Heilungsrate von 10%. Die Nebenwirkungen waren zwar beträchtlich, aber diese Behandlung stellte bis 1934 die einzige systemische Krebstherapie dar. Mit der Entwicklung der Strahlentherapie und Fortschritten in der Chemotherapie geriet das Toxin jedoch in Vergessenheit. Fast 100 Jahre nach Coleys ersten Forschungen berichtete die Gruppe um Carswell von der Existenz eines Proteins, das zur Nekrose bestimmter Tumoren und Tumor-Zelllinien führte und benannten es nach seiner Funktion TNF (**T**umor **n**ecrosis **f**actor). Weiterhin fanden sie heraus, dass TNF nicht bakteriellen Ursprungs war, sondern von Makrophagen und Lymphozyten als Reaktion auf pathogene Infektionen produziert wurde (Carswell et al. 1975). Als knapp 10 Jahre später das Protein isoliert und die zugehörige cDNA sequenziert werden konnte, wurde klar, dass TNF und seine Homologe zu einer großen Zytokin-Familie gehören, der TNF-Superfamilie, die bislang aus 19 verschiedenen Ligand-Proteinen besteht (Pennica et al. 1984; Aggarwal et al. 1985; Aggarwal 2003). Bald nach der Sequenzierung von TNF stellte sich heraus, dass das gleichzeitig von Cerami und Beutler entdeckte Cachectin mit TNF identisch war (Beutler and Cerami 1986).

Unter physiologischen Bedingungen zeigt TNF ein bemerkenswertes funktionales Spektrum, indem es sowohl an Regeneration und Entwicklung, als auch an Signalwegen zur Degeneration und Zerstörung von Zellen und Geweben beteiligt ist. Es gilt als Vermittler von apoptotischen Signalen und Entzündungsreaktionen, sowie als Regulator des Immunsystems und wird mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht wie Diabetes, Krebs, Osteoporose, rheumatoider Arthritis, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Autoimmunerkrankungen (Blam et al. 2001; Taylor et al. 2000; Hehlhans and Pfeffer 2005). Seine biologischen Funktionen vermittelt TNF über die Interaktion mit zwei membranständigen Rezeptoren, TNFR1 und TNFR2. Als gemeinsames Merkmal befinden sich vier sog. CRDs (**c**ysteine **r**ich **d**omains) in ihrer extrazellulären Domäne, während sie sich in ihrer intrazellulären Region durch den Besitz einer Todesdomäne (TNFR1) unterscheiden. Damit stellen die beiden TNF-Rezeptoren typische Vertreter der TNF-Rezeptor-Superfamilie dar (Locksley et al. 2001; Chan et al. 2000; Tartaglia et al. 1993). Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal ist die Verbreitung der Rezeptoren innerhalb des Organismus. Während TNFR1 konstitutiv auf nahezu allen Zelltypen und Geweben exprimiert wird,

findet man den TNFR2 hauptsächlich auf Zellen des Immunsystems, wo seine Expression streng reguliert wird (Aggarwal 2003).

TNF selbst wird als Typ II-Transmembran-Protein exprimiert und als stabiles Homotrimer in der Zellmembran arrangiert (Klostergaard et al., with Tang et al., Hung M-C 1996; Kriegler et al. 1988). Durch die Metallo-Protease TACE (*TNF- α converting enzyme*) kann ein 51 kDa großes Trimer proteolytisch abgespalten und TNF so in seine lösliche Form überführt werden. Sowohl membranständiges als auch lösliches TNF sind biologisch aktiv. Der TNFR2 kann nur durch membrangebundenes TNF vollständig aktiviert werden, während lösliches TNF die größte Affinität zum TNFR1 besitzt (Grell et al. 1998; Grell et al. 1995). Aufgrund seiner Verbreitung und vielfältigen Funktionen wird der TNFR1 als Hauptmediator des TNF-Signals angesehen. Der 55 kDa große TNF-Rezeptor wird als Typ I-Transmembranprotein exprimiert und lagert sich in der Zellmembran über die Bindung sog. PLAD-Domänen (*preligand assembly domain*) zu Trimeren zusammen (Aggarwal et al. 1985; Chan et al. 2000). Nach Bindung des ebenfalls trimerisierten Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, die die nachfolgende Rekrutierung von Adaptermolekülen an die Todesdomäne des Rezeptors erlaubt (Chen and Goeddel 2002b). Verschiedene Adapterproteine und die Bildung unterschiedlicher Komplexe ermöglichen die große Flexibilität und Differenziertheit des TNF-Signals, welches je nach Zelltyp und momentanen physiologischen Bedingungen zu sehr verschiedenen, sogar völlig gegensätzlichen Konsequenzen führen kann. Im Falle der Interaktion von TNF und TNFR1 wird die Dualität des TNF-Signals besonders deutlich. Kann einerseits die so stimulierte Zelle durch die Aktivierung der Caspase-Kaskade in den Tod getrieben werden (siehe 1.2.1), wird die Zelle unter anderen Bedingungen durch die Aktivierung des NF κ B-Signalwegs und somit durch Produktion anti-apoptotischer Proteine davor bewahrt (siehe 1.2.2). Die gleichzeitige Anschaltung von MAP-Kinasen (*mitogen activated protein kinase*) wie p38, JNK und Erk 1/2 können die Signale entweder in die eine oder andere Richtung verstärken (1.2.3).

1.2.1 Apoptotische Signalkaskade des TNFR1

Die ersten Schritte zur Einleitung der Apoptose sind die Rekrutierung der Proteine TRADD (*TNF receptor associated death domain*), FADD (*Fas associated death domain*) und Caspase-8 an die Todesdomäne des TNFR1 in definierter Reihenfolge (Hsu, Shu, et al. 1996). Die Bindung von TRADD an den Rezeptor erfolgt über Wechselwirkungen der Todesdomänen beider Proteine. TRADD fungiert nachfolgend als Plattform für die Interaktion mit FADD, welches über seine „*death effector domain*“ (DED) Caspase-8 rekrutiert. Dieser Komplex bildet den „*death inducing signaling complex*“ (DISC) (Boldin et al. 1995; Muzio et al. 1996). Wie von Schütze et al. gezeigt werden konnte, ist die Internalisierung des TNFR1-DISC-Komplexes für die Induktion der Apoptose

unerlässlich (Schütze et al. 1999). Erst die Vermittlung des Internalisierungssignal durch die sog. TNF-Rezeptor-Internalisierungs-Domäne (TRID) führt zur Assemblierung der DISC-Adapterproteine an die cytoplasmatische Todesdomäne des TNFR1 (Schneider-Brachert et al. 2004). Bei TRID handelt es sich um ein kanonisches Internalisierungsmotiv (YXXW), das bereits von Bonifacino und Traub in Zusammenhang mit der Clathrin-vermittelten Endocytose bestimmter membranständiger Rezeptoren gebracht wurde (Bonifacino and Traub 2003). Schneider et al. konnten beweisen, dass Zellen mit TRID-deletierten TNF-Rezeptoren nach TNF-Behandlung nicht in die Zelle endocytiert wurden. Folglich kam es weder zur Rekrutierung der DISC-Adapterproteine an den Rezeptor, noch zur Aktivierung der Caspase-8 und den nachgelagerten Effektor-Proteasen, so dass die Zellen nicht apoptotisch wurden (Schneider-Brachert et al. 2004), obwohl die Assemblierungsdomäne des Rezeptors, also die Todesdomäne, völlig intakt war.

Die Bedeutung der Endocytose für die Signaltransduktion wurde dann durch die Möglichkeit der Isolierung TNFR1-positiver, endocytotischer Vesikel deutlich. Galt bislang das von Micheau und Tschopp erstellte Modell, in welchem die Idee eines vom TNFR1 dissoziierenden Komplex I, bestehend aus TRADD, RIP1 und TRAF2, zur nachfolgenden Rekrutierung von FADD und Caspase-8 im Cytoplasma favorisiert wurde (Komplex II) (Micheau and Tschopp 2003), konnte dies durch die Isolierung und Analyse von TNFR1-Rezeptosomen widerlegt werden. Es entstand dadurch vielmehr ein Modell, das die schnelle Bildung des DISC am TNFR1 noch an der Zellmembran postuliert, welcher dann in seiner Gesamtheit Clathrin-abhängig internalisiert wird. Die Endocytose des TNFR1 dient daher nicht allein der Terminierung des TNF-Signals, sondern stellt einen komplexen Weg der Signaltransduktion in der Zelle dar. Die Untersuchung der TNFR1-Vesikel, in diesem Zusammenhang als Rezeptosomen bezeichnet, zeigt die kontinuierliche Reifung ausgehend von frühen Endosomen, die nach Fusion mit trans-Golgi-Vesikel zu späten Endosomen, sog. „*multivesicular bodies*“ werden, bis zur Entwicklung lysosomaler Kompartimente. Dies konnte durch den Nachweis entsprechender Markerproteine wie Rab4/Rab5 (frühe Endosomen), GM130 (späte Endosomen, Fusion mit trans-Golgi Vesikeln) und LAMP1 (lysosomale Kompartimente) bewiesen werden. Nach diesem Modell findet auch die autokatalytische Spaltung und Aktivierung der Caspase-8 zum Teil in den Rezeptosomen statt. Nach der Fusion mit trans-Golgi-Vesikeln, die die Pre-pro-Form von Cathepsin D und die inaktive saure Sphingomyelinase (A-SMase) enthalten, kommt es zu einer Aktivierung der A-SMase, die aus Sphingomyelinen Ceramide produziert (Wiegmann et al. 1994). Ceramid ist ein Aktivator von Cathepsin D, woraufhin dieses ins Cytoplasma transloziert und über die Spaltung von Bid die intrinsische, Mitochondrien-assoziierte Apoptose initiiert (Rodman et al. 1990; Heinrich 1999; Heinrich et al. 2004).

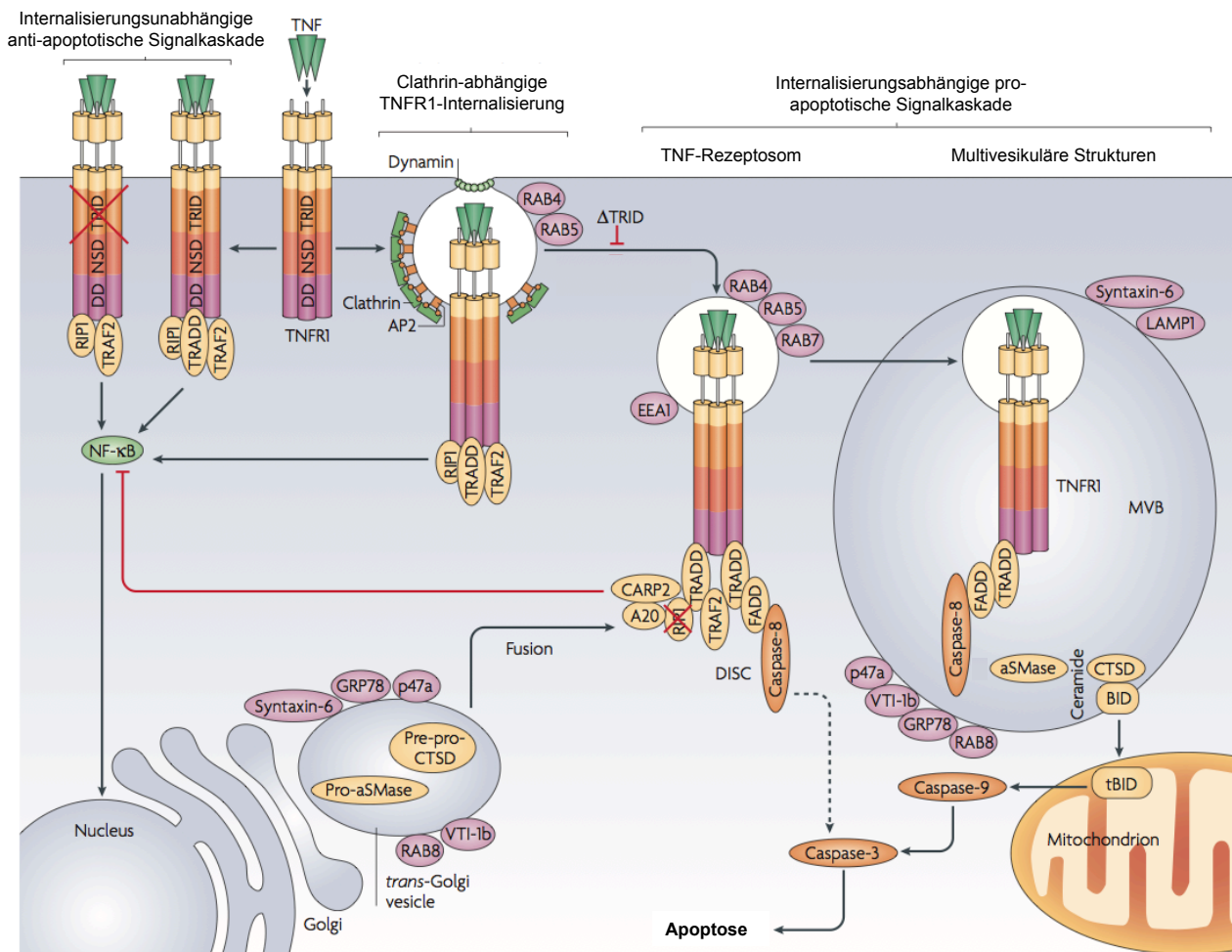


Abb. 1.4 Modell der TNF-TNFR1-Signalkaskade

Die Bindung des Liganden TNF an seinen Rezeptor führt zur Aktivierung zweier Signalkaskaden, die entweder über die Aktivierung des Transkriptionsfaktor NF κ B das Überleben der Zelle fördern oder durch Bildung des DISC (*death inducing signaling complex*) die Apoptose und damit den Tod der Zelle bewirken. Der TNFR1 wird über Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert, wobei der DISC an die Todesdomäne des Rezeptors rekrutiert wird. Ausgehend vom Zustand früher RAB4 und RAB5 positiver Vesikel reifen die Rezeptosomen nach Fusion mit trans-Golgi-Vesikeln zu multivesikulären Endosomen (MVB, *multivesicular bodies*) und lysosomalen Kompartimenten. Die Deletion der Internalisierungsdomäne TRID kann sowohl Endozytose als auch DISC-Assemblierung blockieren. Verändert nach Schütze und Schneider-Brachert 2009.

1.2.2 Die NF κ B-Signalkaskade

Die TNF-induzierte Aktivierung der NF κ B-Signalkaskade ist als gegenregulatorischer Mechanismus zur Apoptose zu verstehen, da er zur Expression anti-apoptotischer Proteine wie cFLIP, cIAP-1 und pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 oder TNF selbst führt (Kumar et al. 2004). Nuklear Faktor kappa B (NF κ B) gehört zu einer Gruppe dimerer Transkriptionsfaktoren, die zur NF κ B/Rel-Familie gehören. Davon sind in Säugerzellen 5 Mitglieder bekannt: NF κ B1/p50, NF κ B2/p52, c-Rel, RelA/p65 und RelB (Verma et al. 1995). Ihnen gemeinsam ist die Rel-homologe Domäne (RHD), Dimerisierung, DNA-Bindung, nukleare Translokation und Interaktion mit

Mitgliedern der $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Familie. Im TNF/TNFR1-Signaltransduktionsweg wird das p50/p65-Heterodimer als Transkriptionsfaktor aktiviert.

Dieser Signalweg beginnt ebenso wie der apoptotische Signalweg mit der Rekrutierung von Adapterproteinen an den TNFR1, wobei die initiale Bindung von TRADD beiden Signalwegen gemeinsam ist. TRADD dient allerdings in diesem

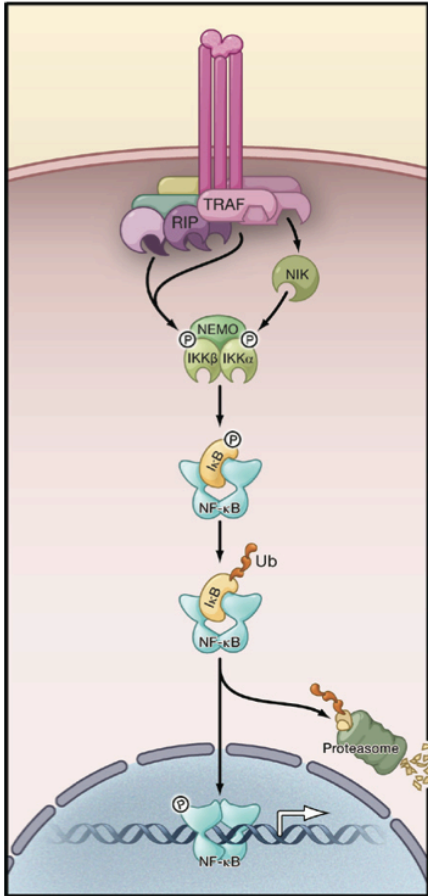


Abb. 1. 5 Schematische Darstellung der NFκB-Aktivierung

Nach Bindung des Liganden an seinen Rezeptor und nachfolgender Rekrutierung der Adapterproteine erfolgt die Aktivierung des IKK im kanonischen Signalweg über den TRAF2/RIP1-Komplex, im nicht-kanonischen Signalweg über den TRAF2/NIK-Komplex. Die Aktivierung von IKK führt zur Phosphorylierung und Degradation von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$. Im Anschluß phosphorylierte NFκB-Dimere binden an κB -DNA-Elemente im Zellkern und induzieren so die Transkription ihrer Zielgene. Nach Hayden und Gosh 2008.

Zusammenhang als Assemblierungsplattform für die Ser/Thr-Kinase RIP1 (*receptor interacting protein 1*) und TRAF2 (*TNF-receptor associated factor 2*) (Devin et al. 2000; Liu, Hsu, et al. 1996; Hsu et al. 1995). Über diesen TRADD-RIP1-TRAF2-Komplex wird der $\text{I}\kappa\text{B}$ -Kinase-Komplex (IKK) an den Rezeptor rekrutiert und aktiviert. Der IKK-Komplex besteht aus zwei nahe verwandten katalytischen Untereinheiten, $\text{IKK}\alpha$ und $\text{IKK}\beta$, und einer regulatorischen Untereinheit $\text{IKK}\gamma/\text{NEMO}$ (Yamaoka et al. 1998; Mercurio et al. 1999; Rothwarf et al. 1998). Die Phosphorylierung der regulatorischen Untereinheit NEMO sorgt für die Freisetzung der katalytischen Untereinheiten, welche direkt den Inhibitor von NFκB ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$) phosphorylieren können. Diese Modifikation macht das Protein als Substrat für eine E3-Ubiquitin-Ligase erkennbar, wonach $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ proteasomal degradiert wird (Perkins 2006). Anschließend kommt es zur Phosphorylierung von p65, einer Untereinheit des p50/p65 NFκB-Heterodimers durch die Proteinkinase A (PKA), welche mit dem NFκB-Komplex assoziiert ist (Chen and Greene 2004). So aktiviertes NFκB transloziert nun vom Cytoplasma, wo es in nicht-induzierten Zustand in Bindung mit $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ vorliegt, in den Zellkern. Dort bindet es an die DNA und leitet die Transkription TNF-regulierter Gene ein (Perkins 2000).

Im Gegensatz zum apoptotischen Signalweg, ist die Aktivierung von NFκB nicht von der Internalisierung des Rezeptors abhängig, sondern kann als membranständiger Komplex die Signaltransduktion einleiten (Micheau and

Tschopp 2003; Schneider-Brachert et al. 2004). Dabei wird die Zusammenlagerung stimulierter TNF-Rezeptoren in Mikrodomänen, sog. *lipid rafts*, in der Membran postuliert (Legler et al. 2003). Die Blockade der Endocytose des TNFR1 durch MDC (Monodansylcadaverin) oder TRID-Deletion hatte keinen Einfluss auf die Rekrutierung der Adapterproteine und Aktivierung des NFκB-

Signalweges (Schütze et al. 1999; Schneider-Brachert et al. 2004). Die Rolle der TRADD-Rekrutierung wird allerdings kontrovers diskutiert. Nach Schneider et al. können RIP1 und TRAF2 direkt mit der Todesdomäne des Rezeptors interagieren, ohne TRADD dabei als Mediator zu brauchen (Schneider-Brachert et al. 2006; Schneider-Brachert et al. 2004). Dazu konträr konnte aber in TRADD-defizienten Zellen die völlige Abrogation der NF κ B-Aktivierung gezeigt werden (Ermolaeva et al. 2008; Pobezinskaya et al. 2008). Diese Differenz könnte auf experimentalen oder zelltypspezifischen Bedingungen beruhen.

Die Rekrutierung des IKK an den TNFR1 erfolgt wie bereits erwähnt über die Interaktion von NEMO mit RIP1 (Hayden and Ghosh 2008; Zhang et al. 2000). RIP1 besteht aus drei Domänen: einer C-terminalen Todesdomäne, einer intermediären Domäne und einer N-terminalen Kinase-Domäne, wobei die Kinase-Domäne mit der NF κ B-Aktivierung nicht in Verbindung steht (Hsu, Huang, et al. 1996; Ting et al. 1996). Die intermediäre Domäne allerdings vermittelt nicht nur die Interaktion mit IKK, sondern auch die Bindung von TRAF2 (Hsu, Huang, et al. 1996). TRAF2 verfügt über N-terminale RING-Finger-Domänen, die als E3-Ubiquitin-Ligase fungieren und für die induzierte Ubiquitinierung von RIP1 verantwortlich sind. Dabei handelt es sich aber nicht um K48-gekoppelte Ubiquitinierung, ein Signal zur proteasomalen Degradation, sondern um eine K63-gekoppelte Ubiquitinierung, die ähnlich wie Phosphorylierung als Proteinmodifikation wahrgenommen wird (Chen et al. 2006; Li et al. 2006; Ea et al. 2006). Für Aktivierung des IKK wird angenommen, dass durch die Bindung von NEMO an ubiquitiniertes RIP1 eine Konformationsänderung im IKK-Komplex stattfindet, die die Phosphorylierung der enzymatischen Komponenten erlaubt (Wu et al. 2006a; Wu et al. 2006b; Hayden and Ghosh 2008). Die so aktivierten I κ B-Kinasen können nun direkt I κ B α phosphorylieren und die Aktivierung von NF κ B einleiten.

Da die andauernde Aktivierung des NF κ B-Signalweges zu chronischen Entzündungen und Dysregulation des Immunsystems führen würde, kann das NF κ B-Signal durch negative *feedback-loops* und die Verschiebung bestimmter Proteinverhältnisse terminiert werden. Unter negativen *feedback-loops* versteht man die Expression von Proteinen, die durch das Signal induziert werden und nachfolgend für dessen Beendigung sorgen. Im Fall des NF κ B-Signalweges sind dies unter anderem der Inhibitor von NF κ B selbst (I κ B α), das Ubiquitin-modulierende Enzym A20 und die De-Ubiquitinase CYLD. Die Neusynthese von I κ B α wirkt durch die Bindung an cytoplasmatische p50/p65-Heterodimere als „Aus-Knopf“ (Hoffmann et al. 2002). A20 entfernt einerseits K63-gekoppeltes Ubiquitin, fördert aber K48-gekoppelte Ubiquitinierung und damit die proteasomale Degradierung von RIP1 und NEMO (Wertz et al. 2004). Dabei wird die RIP1-A20-Interaktion über das Protein Itch vermittelt (Shembade et al. 2008). CYLD entfernt spezifisch K63-gekoppelte Ubiquitinketten von RIP1.

1.2.3 Aktivierung der MAP-Kinasen p38, JNK und Erk

Die Aktivierung von MAP-Kinasen (*mitogen activated protein kinase*) ist eine der vielen zellulären Reaktionen auf TNF-Stimulation (Liu and Han 2001). Während aber die TNF-induzierte Vermittlung apoptotischer Signale und die NF κ B-Aktivierung schon relativ gut verstanden sind, sind die Mechanismen, die zur TNF-abhängigen Aktivierung der MAP-Kinasen führen bis heute nicht vollständig geklärt. Die Regulation zellulärer Prozesse durch MAPK umfasst ein weites Spektrum, das von der Kontrolle der Gen-Expression, Zellproliferation, Aktivierung von Überlebensprogrammen (*cell survival*) bis zur Beteiligung an Zelltod-assoziierten Prozessen und Zell-Motilität reicht (Chang and Karin 2001).

Die in Säugetieren vorkommenden MAP-Kinasen können in vier Gruppen eingeteilt werden: Erk (*extracellular-signal-regulated kinases*), JNK (c-Jun aminoterminal kinase), p38 MAPK und Erk5 (Karin 1998; Davis 1999). Die Kinase-Aktivität der MAP-Kinasen richtet sich dabei meist auf

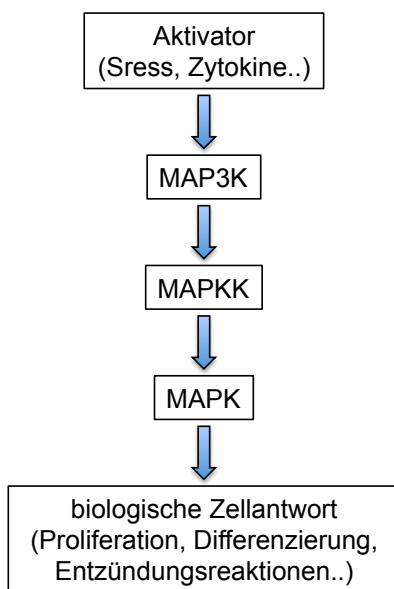


Abb. 1.6 Schema der MAPK-Signalkaskade

Transkriptionsfaktoren im Zellkern wie AP-1, Elk-1, CREB oder c-Jun (Martín-Blanco 2000). Die Signalkaskade zur Aktivierung der MAPK verläuft über mehrere „Kinase-Ebenen“, was zu einer hohen Komplexität der Signaltransduktion führt, aber auch Diversität und Flexibilität in der Reaktion auf verschiedene Stimuli zulässt und das große, zum Teil gegensätzliche Spektrum der MAPK-Wirkung erklärt. Da verschiedene MAPK durch die selben MAP3Ks aktiviert werden können, wie es im Fall von JNK und p38 der Fall ist, ist eine Vernetzung und gegenseitige Beeinflussung der Signalwege nicht auszuschließen (Wajant et al. 2003). Auch der sog. „*cross-talk*“ zwischen MAPK- und NF κ B-Signalwegen wird diskutiert (Wajant et al. 2003; Vanden Berghe et al. 1998).

Die TNFR1-assoziierten Proteine RIP1 und TRAF2 können zu den MAP4K gerechnet werden, da sie in der Hierarchie der Aktivierungs-Kinasen an oberster Stelle stehen (Keshet and Seger 2010) (Abb. 1.7). Ihre Bedeutung für die Aktivierung von Erk, JNK und p38 durch TNF konnte vor einigen Jahren von Devin et al. deutlich gemacht werden, indem in RIP1- bzw. TRAF2-defizienten Zellen eine verminderte Induktion der MAP-Kinasen detektiert werden konnte (Devin et al. 2003). Dieses Ergebnis ist bezüglich des JNK-Aktivierungsmechanismus konträr zu früheren Studien von Kelliher, die in den gleichen Zellen diesen Mechanismus als RIP1-unabhängig darstellte (Kelliher et al. 1998). TRAF2 hingegen scheint in die Aktivierung aller drei MAPK-Kaskaden involviert zu sein, auch wenn die Zwischenstufen zu den entsprechenden MAPKKs bislang noch nicht bis ins Detail geklärt sind. Es konnte aber gezeigt werden, dass TRAF2 essentiell für die TNF-induzierte JNK Aktivierung ist (Liu, Hsu, et al. 1996; Reinhard 1997; Yeh et al. 1997) und die Überexpression von TRAF2 zur Aktivierung von Erk und p38 führt (Liu and Han

2001). Eine TRAF2 unabhängige Erk-Aktivierung konnte außerdem von Hildt und Oess vorgestellt werden, die über die Aktivierung von Ras durch Grb2, ein cytosolisches Adapterprotein des TNFR1, zur Phosphorylierung von MEK1/2 führt (Hildt and Oess 1999).

Ein mögliches Modell der MAPK-Signaltransduktionskaskaden ist in Abbildung 1.7 gezeigt.

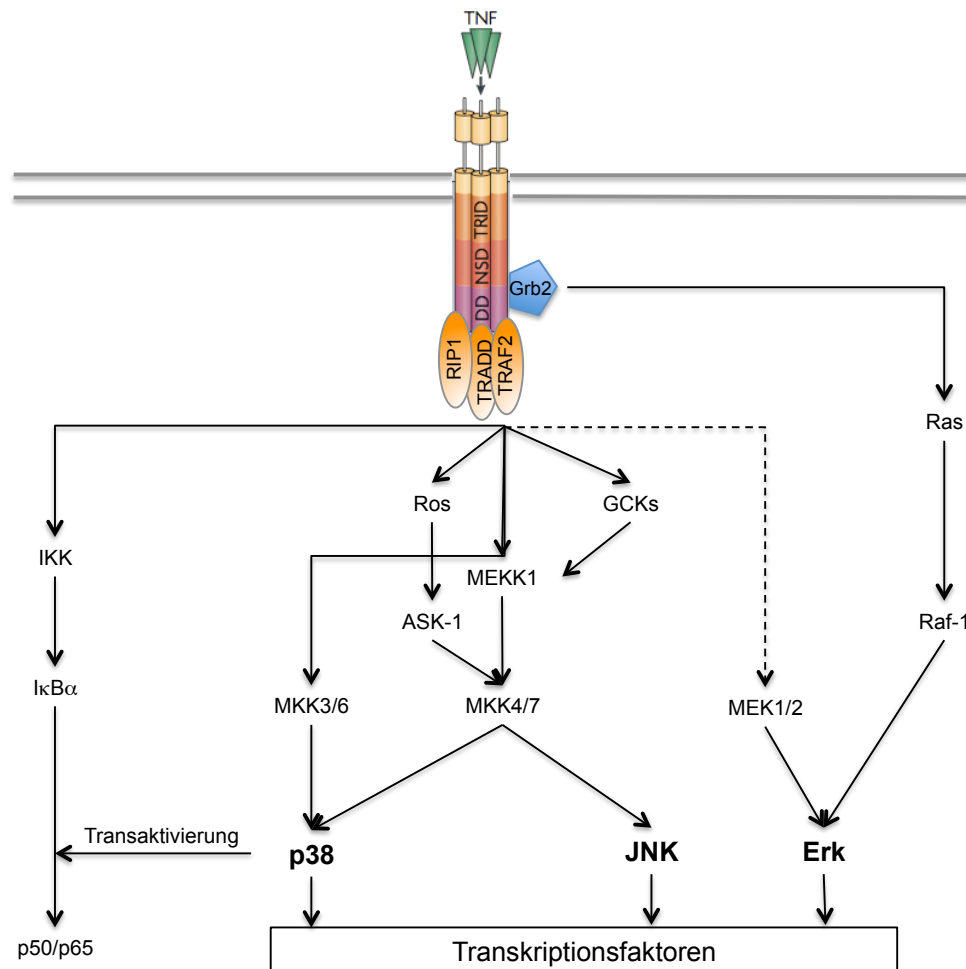


Abb. 1.7 Aktivierung der MAPK p38, JNK und ERK nach TNF-Stimulation

Die Aktivierung der MAPK erfolgt hauptsächlich über den TRAF2/RIP1-Komplex, im Falle von Erk aber auch über die Aktivierung von Ras/Raf durch Grb-2.

Abkürzungen: ROS (reactive oxygen species), GCK (germinal center kinase), Grb-2 (growth factor receptor bound protein), ASK-1 (apoptosis signal-regulating kinase-1), MKK (Map-Kinase kinase), MEK (MAP-Kinase Erk kinase), MEKK (MEK kinase)

1.3 Virale Mechanismen zur Abwehr der Apoptose

Die Apoptose ist nicht nur ein zellulärer Mechanismus, um defekte oder beschädigte Zellen ohne Entzündungsreaktion zu entfernen, sie dient auch der Eliminierung virusinfizierter Zellen, noch vor Einsetzen der adaptiven Immunantwort (Vaux et al. 1994). Die zelluläre Fähigkeit eindringende Viren zu erkennen und das Zelltodprogramm zu aktivieren führte allerdings auch dazu, dass Viren im Laufe der Co-Evolution mit ihren Wirten selbst unzählige Mechanismen zur Inhibition der Apoptose und zur Anpassung an das Immunsystem entwickelten (Tortorella et al. 2000; Benedict et al. 2002). Die Inhibition der Apoptose kann sowohl auf Rezeptor-Ebene stattfinden (Tollefson et al. 1998), durch direkte oder indirekte Hemmung von Caspasen (Best 2008; Benedict et al. 2002; Benedict et al. 2003), als auch durch Regulation mitochondrialer Prozesse (Galluzzi et al. 2008; Boya et al. 2004). Auf Rezeptor-Ebene gibt es eine Reihe viraler Proteine, die mit der Rezeptor-Ligand-Interaktion interferieren. Dies kann zum Beispiel über die Nachahmung des TNFR1 entstehen (z.B. Crm-Proteine der Kuhpockenviren), durch Internalisierung und Degradation des Rezeptors (RID-Komplex bei Adenoviren) oder durch Bindung viraler Faktoren an die Todesdomäne des Rezeptors (NS5A-Protein aus Hepatitis C Viren), um die intrazelluläre Signalweiterleitung zu stören und die extrinsische Aktivierung von Caspasen zu verhindern (Smith 1994; Clayton and Hardwick 2008; Schreiber et al. 1997; Upton et al. 1991).

Da viele der Schlüsselereignisse während der Apoptose durch Caspasen vermittelt werden, gibt es eine Reihe viraler Proteine, die die Aktivierung von Caspasen durch direkte oder indirekte Interaktion verhindern. Viele dieser Proteine sind ortholog zu zelleigenen regulatorischen Faktoren. cFLIPs (*cellular FLICE like inhibitory protein*) sind zelluläre Orthologe der viralen FLIPs (vFLIP), die erstmals in Herpesviren identifiziert werden konnten (Best 2008; Thome and Tschoop 2001; Bertin et al. 1997). vFLIPs besitzen wie einige Caspasen DED-Domänen und verhindern durch kompetitive Bindung an FADD die Oligomerisierung und autokatalytische Aktivierung der Caspasen an der Todesdomäne des Rezeptors (Yang et al. 2005). vFLIPs zielen damit hauptsächlich auf Caspase-8 und -10 Aktivierung. Außerdem können sie mit NF κ B-regulierenden Proteinen wie RIP1, TRAF2 oder IKK β interagieren und so die Expression anti-apoptotischer Faktoren induzieren.

Eine weitere Möglichkeit indirekter Caspase-Hemmung bieten sog. vIAPs (*virale Inhibitor of Apoptosis Protein*), für die es ebenfalls entsprechende zelleigene Proteine (cIAP) gibt. cIAPs hemmen die Aktivierung von Caspase-3, -9 und -7 durch direkte Bindung über eine ihrer drei BIR-Domänen (*Baculovirus IAP Repeated domain*) und besitzen zudem eine weitere Domäne (RING) mit E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität (Vaux and Silke 2005). Durch IAP-Antagonisten kommt es zu ihrer Auto-Ubiquitinierung und Aktivierung der Caspasen (Salvesen and Duckett 2002). Virale IAPs besitzen ein bis zwei BIR-Domänen, die aber nicht zur direkten Caspase-Interaktion genutzt werden, sondern vielmehr zum Abfangen von IAP-Antagonisten gedacht sind. Über ihre Ubiquitin-Ligase-Funktion sorgen sie anschließend für deren proteasomalen Abbau. Damit verhindern sie

den Bindungsverlust der cIAPs mit ihren Caspase-Molekülen und folglich deren Aktivierung. Ein Beispiel für Inhibition durch direkte Bindung ist das virale Protein p35, ein in Baculoviren identifizierter Breitband-Caspase-Inhibitor (Clem et al. 1991). Ähnlich wie CrmA dient p35 als sog. Pseudosubstrat, indem es an das aktive Zentrum aktivierter Caspasen bindet.

Die mitochondriale Apoptose wird generell von Bcl-2-Proteinen reguliert. Virale Homologe der anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine, wie das HVS-bcl2-Protein der Herpesviren, besitzen die gleiche dreidimensionale Struktur wie ihre zellulären Partner, sind aber im Unterschied gegen zellregulatorische Mechanismen, wie die Spaltung durch Caspasen, resistent. Wie zelluläres Bcl-2 verhindern sie die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und damit die Freisetzung von Cytochrom c und nachfolgende Caspase-Aktivierung (Galluzzi et al. 2008; Boya et al. 2004).

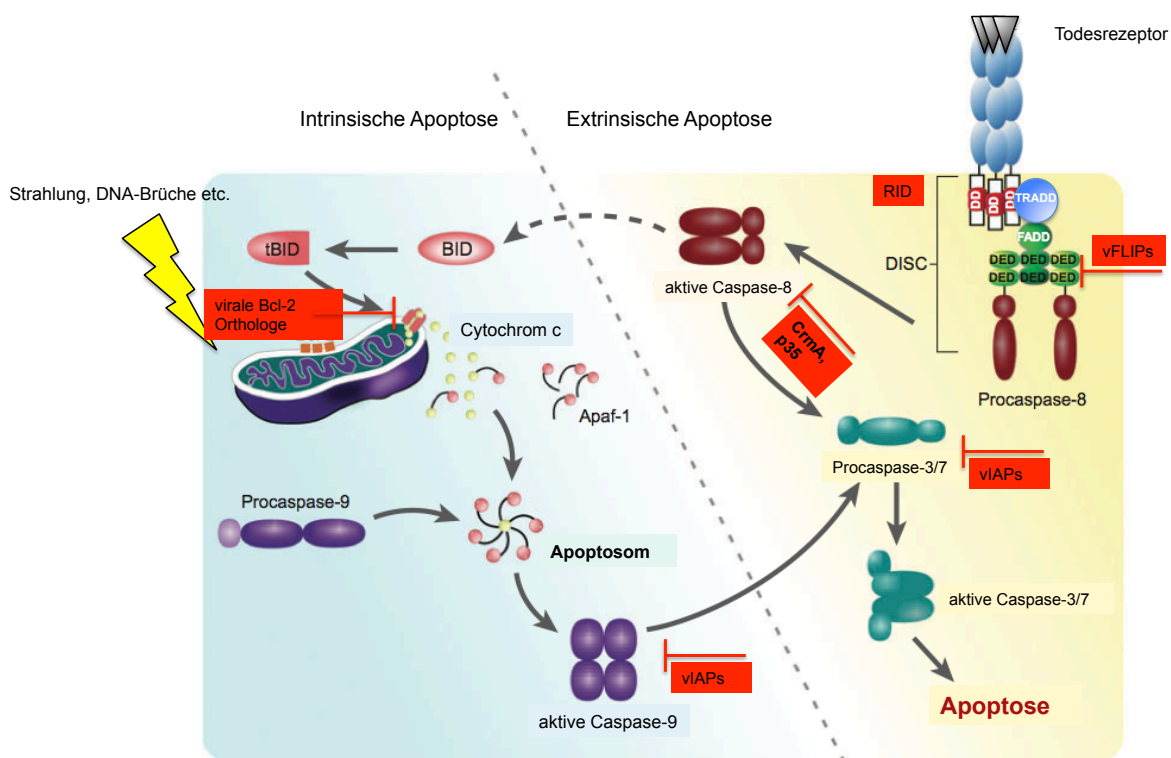


Abb. 1.7 Virale Inhibitoren der Apoptose

Virale Bcl-2 orthologe Proteine hemmen wie ihre zellulären Partner die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium. vIAPs inhibieren die Aktivierung der Effektor-Caspasen-9, -3 und -7. Durch direkte Bindung wird durch CrmA und p35 die Aktivierung der Initiator-Caspase-8 verhindert, während außerdem vFLIPs indirekt durch Interaktion mit FADD die Oligomerisierung und autokatalytische Aktivierung der Caspase-8 hemmt. Der adenovirale RID-Komplex sorgt für die rasche Terminierung des apoptotischen TNF-Signals, indem es die Internalisierung und Degradation des Rezeptors induziert. Verändert nach Best et al., 2008.

1.4 Proteine der adenoviralen E3-Region und ihre Interaktion mit Immunregulatoren

Adenoviren wurden nach ihrer Isolierung aus humanen adenoiden und respiratorischen Sekreten erstmals als die Verursacher cytopathischer Effekte in humanen Zellkulturen beschrieben (Knipe 2001). Basierend auf der Resistenz gegenüber neutralisierenden Antikörpern können bislang mindestens 51 Serotypen unterschieden und anhand von Hämagglutinationsverhalten, Onkogenität und Genom-Homologie in sechs Untergruppen (A-F) gegliedert werden. Adenoviren können sowohl Säugetiere als auch Vögel infizieren, bei denen sie abhängig von Serotyp und Gewebsspezifität verschiedene Krankheiten auslösen. Viren der verbreiteten Untergruppe C, die die Serotypen 1, 2, 5 und 6 einschließt, sind nahezu über die ganze Welt verbreitet und verursachen Infektionen der oberen Atemwege, wobei die klinischen Symptome von milder Pharyngitis bis zu ernstesten respiratorischen Erkrankungen wie Pneumonie reichen (Knipe 2001). Das Genom der Adenoviren besteht aus doppelsträngiger DNA und enthält mehr als 20 Gene, deren Expression in frühe und späte Phasen des Infektionszyklus eingeteilt werden kann. Die frühen (*early*, E-) Gene sind an der Kontrolle der DNA-Synthese (E1A, E1B), der Transkription (E1A), dem Transport viraler mRNA ins Cytoplasma (E1B55K/E4Orf6) oder der Immunregulation (E3, E1B und E4) beteiligt, die späten (*late*, L-) Gene codieren hauptsächlich für Strukturproteine (Horwitz 2004).

Die Proteine der E3-Region sind zwar für die Replikation des Virus sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nicht essentiell, besitzen aber immunmodulierende Eigenschaften, die dem Virus helfen, zelluläre Immunantworten des Wirtes zu unterdrücken (Horwitz 2004). So bindet E3-gp19K an Klasse I MHC-Proteine im rauen ER und blockiert damit den Transport der MHC-Moleküle an die Zelloberfläche. Virale Peptide können somit nicht an der Zelloberfläche präsentiert werden, weshalb die infizierten Zellen der Erkennung durch cytotoxische T-Zellen entgehen (Burgert et al. 1987; Burgert and Kvist 1985). Zwei weitere Proteine der E3-Region, 10.4K und 14.5K, bilden zusammen den sog. RID-Komplex (*receptor internalization and degradation*) und blockieren sowohl TNF-, Fas- als auch TRAIL-induzierte Apoptose (Benedict and Ware 2001; Mahr and Gooding 1999; McNees and Gooding 2002; Elsing and Burgert 1998; Burgert et al. 2002). Während der Mechanismus zur Inhibition der TNF-medierten Apoptose durch RID noch nicht vollständig verstanden ist, wird die Fas-vermittelte Apoptose durch Internalisierung und Degradation des entsprechenden Rezeptors untergraben. Komplexiert RID zusätzlich mit E3-6.7K kann auf gleichem Wege auch der TRAIL-induzierte Zelltod blockiert werden (Benedict et al. 2001).

E3-14.7K schließlich blockiert die TNF- und TRAIL vermittelte Apoptose nicht nur im Kontext einer Infektion, sondern auch, wenn es allein in Zellen zur Expression gebracht wird (Gooding 1988; Horton et al. 1991; Gooding et al. 1990; Tollefson et al. 2001). Die zu Grunde liegenden

Mechanismen sind größtenteils unbekannt. Im folgenden Abschnitt soll die Rolle von E3-14.7K im Kontext der TNF/TNFR1-Signaltransduktion näher erklärt werden.

1.5 Beteiligung von E3-14.7K an NF κ B-Signalweg und TNFR1-Internalisierung

E3-14.7K (im Folgenden kurz 14.7K) ist ein mit einer Homologie von bis zu 70% zwischen verschiedenen Adenovirus-Subgenera hoch konserviertes Protein (Abb. 1.8). 14.7K gilt als genereller Inhibitor der TNF-medierte Apoptose (Gooding et al. 1990; Burgert et al. 2002). Es handelt sich um ein lösliches Protein, das im Cytosol ebenso wie im Zellkern lokalisiert sein kann (Gooding 1988). Es ist aber nicht nur hinsichtlich seiner anti-apoptotischen Eigenschaften bemerkenswert, sondern besitzt auch eine einzigartige Struktur, zu der bislang keine vergleichbaren Homologien zu einem bereits bekannten Protein gefunden werden konnten. Strukturelle Analysen von Kim und Foster zeigten, dass der C-Terminus des Proteins durch Trypsin höchstens an zwei Stellen (nach Aminosäure 24 und 31) zu einem 12 kDa bzw. 11 kDa großen Degradationsprodukt gespalten werden kann (Kim and Foster 2002). Die Sekundärstruktur von 14.7K setzt sich nach den Berechnungen verschiedener Programme (Predict protein Server, PSIREN) aus zwei α -Helices zusammen, die N- und C-terminal 6 β -Faltblattstränge umfassen (Abb. 1.8). Der Verdau mit Trypsin kann also maximal zur Abspaltung der amino-terminalen α -Helix führen. Im C-terminalen Teil des Proteins befinden sich zudem drei konservierte Cysteine an den Positionen 44, 50 und 119, die für die Bindung von Zink- und Cobalt-Ionen verantwortlich sind (Kim and Foster 2002). Die Punktmutation oder Deletion eines oder mehrerer dieser Cysteine führt zu Funktionsverlust und Instabilität (Ranheim et al. 1993). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass 14.7K über seinen C-Terminus mit sich selbst und seinen zellulären Bindungspartnern interagiert. Der Grad der Selbst-Oligomerisierung wird dabei auf ein Nonamer geschätzt. Die anti-apoptotischen Eigenschaften konnten jedoch keiner speziellen Proteinregion zugewiesen werden, wie sich nach strukturellen Funktionsanalysen durch Ranheim et al. herausstellte (Ranheim et al. 1993). Nahezu jede Mutation führte zum Funktionsverlust, vermutlich durch eine gravierende Veränderung der Tertiärstruktur.

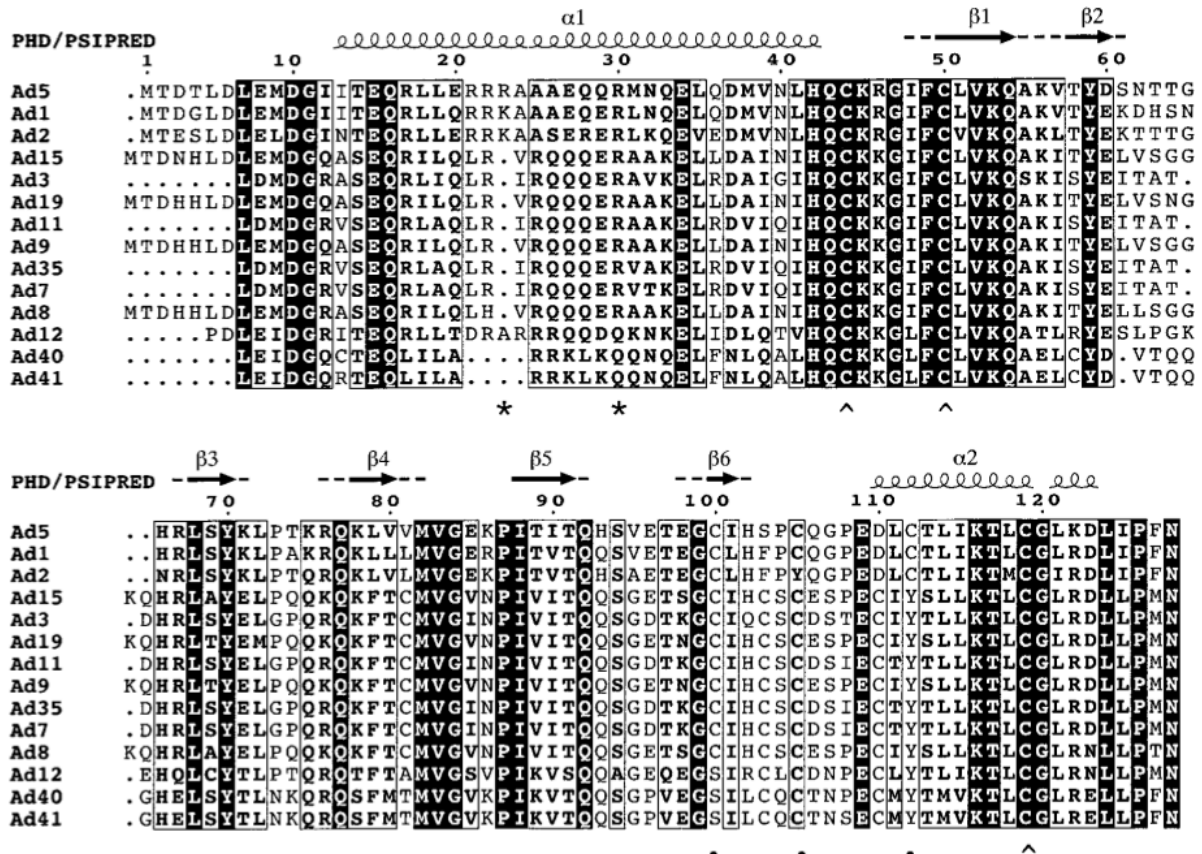


Abb. 1.8 Sequenz-Alignment und Sekundärstruktur von 14.7K

Darstellung der Sekundärstruktur von 14.7K durch PHD/PSIPRED und Vergleich verschiedener Adenovirus-Serotypen. Konservierte Bereiche sind schwarz hinterlegt, Trypsin-Schnittstellen sind mit einem Stern gekennzeichnet. Konservierte Cysteine sind mit Punkten markiert, die drei für die Metall-Ionen-Bindung wichtigen Cysteine sind mit ^ kenntlich gemacht. Nach Kim und Foster 2002.

Im adenoviralen Genom steht die E3-Region als einzige unter der Kontrolle eines Promotors mit κ B-Bindungsstellen und ist somit durch die TNF-stimulierte Aktivierung des NF κ B-Signals induzierbar (Mahr et al. 2003). Die Aktivierung von NF κ B ist demnach für das Virus von großer Wichtigkeit. Dennoch gibt es in vielen Virusfamilien eine Reihe viraler Proteine, die die NF κ B-Signalweiterleitung verhindern, da die Produktion inflammatorischer Zytokine wie IL-6 und IL-12 während der Infektion eingeschränkt werden muss (Hiscott et al. 2001). In Makrophagen, die entweder mit einem Wildtyp-Adenovirus oder mit einer 14.7K-deletierten Variante infiziert worden waren konnte gezeigt werden, dass 14.7K die Ausschüttung der genannten Zytokine hemmen konnte. Dabei waren aber weder die Degradierung des NF κ B-Inhibitors I κ B α , noch die Translokation von NF κ B in den Zellkern gestört (Carmody et al. 2006). Dieser Effekt konnte darauf zurückgeführt werden, dass 14.7K die Interaktion von NF κ B mit seinem Promotor und damit seine Aktivierung verhindert. Carmody et al. fanden heraus, dass 14.7K mit p50, einer Komponente des NF κ B-Dimers (p50/p65), interagiert und dessen Bindung an den NF κ B-Promotor inhibiert (Carmody et al. 2006). Die infizierte Zelle entgeht damit der Immunantwort des Wirtes und das Virus kann sich in der Zelle replizieren.

Die Mechanismen über die 14.7K mit der TNF-induzierten Apoptose und dem TNFR1-Signalweg interferiert waren lange völlig unklar und sind bis heute nicht bis ins Detail verstanden. Die Anwesenheit von 14.7K in der Zelle führt weder zu einer Verringerung des TNFR1 an der Zelloberfläche, noch interagiert 14.7K direkt mit dem Rezeptor (Gooding et al. 1990; Horton et al. 1991). Allerdings konnte durch Verwendung radioaktiv-markierten TNFs gezeigt werden, dass die Internalisierung des Rezeptors in Anwesenheit von 14.7K nach TNF-Stimulation gehemmt war (Schneider et al. 2006). Als durch Schütze et al. die Abhängigkeit der Apoptose-Inhibition von der TNFR1-Internalisierung deutlich wurde und ein paar Jahre später durch Schneider et al. der Zusammenhang mit der Rekrutierung der DISC-Adapterproteine an den Rezeptor gezeigt werden konnte, wurde für die 14.7K-vermittelte Blockade der Apoptose ein Mechanismus ähnlich der Apoptosehemmung durch die erwähnte TRID-Deletion (siehe 1.2.1) postuliert (Schütze et al. 1999; Schneider-Brachert et al. 2004, Schneider-Brachert et al. 2006). Tatsächlich konnten aus Adenovirus-infizierten oder aus lediglich 14.7K-exprimierenden Zellen TNFR1-Komplexe isoliert werden, die ähnlich wie nach TRID-Mutation zwar Adapterproteine zur Aktivierung des NF κ B-Signalweges (RIP1, TRAF2) enthielten, aber nicht die Adapterproteine des DISC (Schneider-Brachert et al. 2006). Die für die Internalisierung wichtigen Proteine der Endocytosemaschinerie wie Dynamin 2 und Rab 5 konnten ebenfalls nicht detektiert werden. Da 14.7K selbst nicht am Rezeptor oder in einem Komplex mit TNFR1 beobachtet werden konnte, war immer noch unklar, an welchem Punkt das virale Protein zur Inhibition der Apoptose ansetzte. Es begann die Suche nach intrazellulären Bindungspartnern, die sowohl den anti-apoptotischen Effekt als auch den Einfluss auf die Endocytose vermitteln könnten und eine Verbindung zum TNFR1-assoziierten NF κ B-Signalweg herstellen würden.

Über ein *yeast-two-hybrid screening* wurden vier zelluläre Interaktionspartner von 14.7K identifiziert, sog. FIPs (**14.7K interacting proteins**), die diese Bedingungen zum Teil auch erfüllten (Horwitz 2004). FIP-1 ist eine kleine GTPase, auch bekannt als RagA (Li et al. 1997; Hirose et al. 1998), die mit Bestandteilen von Mikrotubuli interagiert. FIP-2, oder Optineurin, wurde im Zusammenhang mit Apoptose, Exo- und Endocytose, sowie als Regulator inflammatorischer Prozesse beschrieben (Sahlender et al. 2005; Zhu et al. 2007; De Marco et al. 2006). FIP-3, besser bekannt als NEMO oder IKK γ , ist als Untereinheit des IKK an der Regulation des NF κ B-Signalweges beteiligt und kann selbst abhängig vom Expressionsniveau sowohl pro- als auch anti-apoptotische Wirkung auf die Zelle haben. Die durch Überexpression von NEMO verursachte Apoptose kann bis zu 70% durch 14.7K blockiert werden (Li et al. 1999). Ein anderer Bindungspartner ist der „*apoptosis inducing factor*“ AIF (FIP-4), ein Protein das mit mitochondrialen Mechanismen der intrinsischen Apoptose assoziiert ist (Daugas et al. 2000).

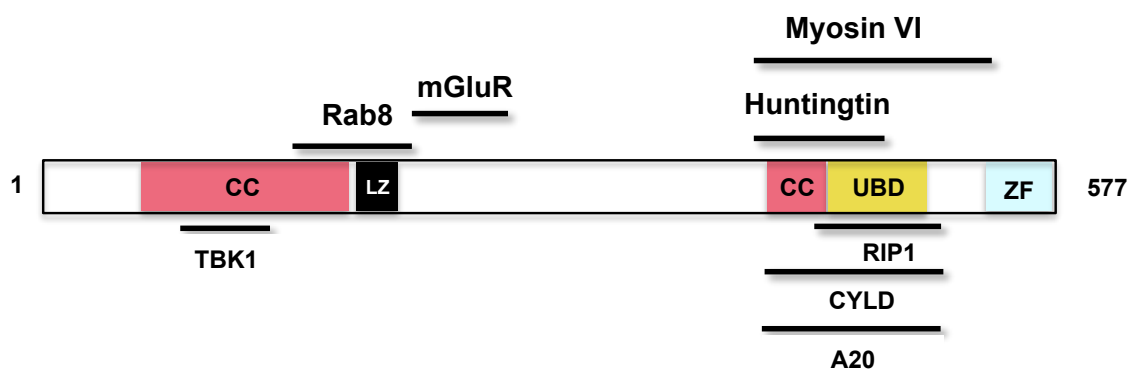
Von diesen vier Kandidaten, die mit 14.7K interagieren, erfüllt Optineurin (FIP-2) die geforderten Bedingungen, also sowohl Beteiligung an Apoptose-assoziierten- sowie an vesikulären Transportprozessen, am besten, weshalb diese Interaktion zentraler Gegenstand der vorliegenden

Arbeit ist. Struktur und Funktion von Optineurin werden daher im folgenden Abschnitt ausführlich beschrieben.

1.6 Optineurin

Optineurin ist ein lösliches Protein aus 577 Aminosäuren, das in vielen Geweben exprimiert wird, darunter Muskelgewebe, Epithelien und okulares Gewebe (Trabekelwerk) (Ying et al. 2010). Als möglicher Verursacher einer neurodegenerativen Augenkrankheit, dem Glaukom, wurde das Gen von Sarfarazi et al. identifiziert und tatsächlich konnte ein paar Jahre später die Beteiligung einer mutierten Form von Optineurin (E50K) an der erblichen Form des Offenwinkelglaukoms nachgewiesen werden (Sarfarazi et al. 1998; Rezaie et al. 2002). Der Name stammt daher aus seiner Funktion als „**Optic Neuropathy Inducing Protein**“.

In der Zelle ist das Protein in vesikulären Strukturen in der Golgi-Region lokalisiert, wobei auch zelltypabhängig eine diffuse Verteilung im Cytoplasma beobachtet werden konnte (Chalasani et al. 2008). Die Struktur des Proteins enthält mehrere Motive, die die verschiedenen Funktionen und Interaktionen des Proteins mit diversen Bindungspartnern vermitteln. Dazu zählen zwei *coiled-coil*-Domänen (CC), die den beiden amino- und carboxy-terminal gelegenen Leucin-Zippern (LZ) vorgeschaltet sind, sowie eine C-terminale Ubiquitin-Bindedomäne (UBD) und eine Zink-Finger-Domäne (ZF).



1.9 Domänen-Struktur von Optineurin

Die Sekundärstruktur von Optineurin enthält mehrere Motive, die zur Vermittlung seiner Funktion und Interaktion mit verschiedenen Bindungspartnern beitragen. Verändert nach Chalasani et al. 2009 und Swarup 2010.

Da der C-Terminus von Optineurin und NEMO/IKK γ zu 53% homolog sind, wurde Optineurin auch unter der Abkürzung NRP (**NEMO related protein**) bekannt (Schwamborn et al. 2000; Journo et al. 2009).

Li und Kollegen konnten die Bindungsstelle von 14.7K mit Optineurin auf den C-Terminus von Optineurin eingrenzen und zeigten außerdem, dass durch die Überexpression von Optineurin der

anti-apoptotische Effekt von 14.7K nach TNFR1-induzierter Apoptose revertiert werden konnte (Li, Kang, et al. 1998). Sie führten die Umkehr des Effekts auf die Interaktion der beiden Proteine zurück, da eine bindingsdefiziente, C-terminale Deletionsmutante von Optineurin unter den gleichen Bedingungen nicht zur Aufhebung der Zelltod-Blockade in der Lage war. Die Überexpression von Optineurin allein verursachte aber nicht den Tod der Zellen.

Wie bereits beschrieben, wird über TNFR1 nicht nur die Apoptose von Zellen eingeleitet, sondern auch der NF κ B-Signalweg zu dessen Gegenregulation aktiviert. Die siRNA-vermittelte Suppression endogenen Optineurins führte sowohl zu einer Erhöhung der basalen, als auch der TNF-induzierten NF κ B-Aktivität, während eine Überexpression zur Hemmung des Signalwegs führte (Zhu et al. 2007). Die negative Regulation der NF κ B-Aktivierung könnte allein aus der Konkurrenz mit NEMO um die Bindung an ubiquitiniertes RIP1 resultieren, scheint aber noch wesentlich komplizierter zu sein, da Optineurin mit zwei weiteren negativen Regulatoren des NF κ B-Weges interagiert, der De-Ubiquitinase CYLD und dem Ubiquitin-modulierenden Enzym A20 (Chalasani et al. 2009) (siehe 1.2.2). Nagabhusana et al. entwickelten daraufhin ein Modell zur Regulation der TNF-induzierten NF κ B-Aktivierung, in dem Optineurin als Adapter für A20 und CYLD zur Rekrutierung an den TNFR1-Proteinkomplex aufzufassen ist und NEMO gleichzeitig aus diesem Komplex verdrängt (Nagabhushana et al. 2011).

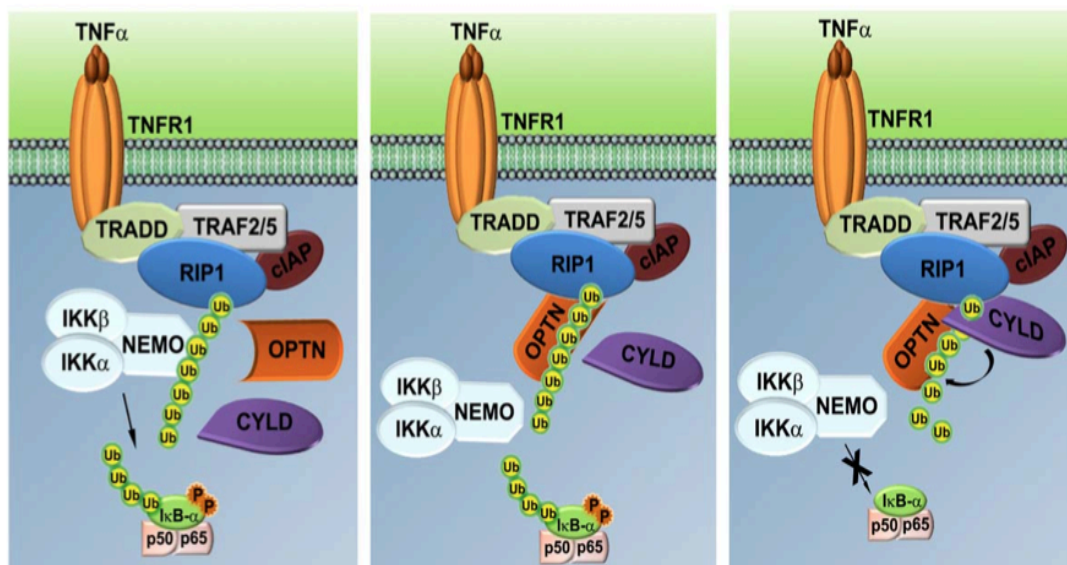


Abb. 1.10 Modell zur Regulation der TNF-induzierten NF κ B-Aktivität durch Optineurin

Die Bindung von TNF an seinen Rezeptor verursacht die Assemblage eines Multi-Proteinkomplexes an den TNFR1, wobei RIP1 K63-gekoppelt ubiquitiniert wird. Daraufhin wird NEMO an den Komplex rekrutiert, was zur Aktivierung von IKK führt (links). Optineurin konkurriert mit NEMO um die Bindung an RIP1, worauf dieses aus dem Komplex verdrängt wird (mittig). Über Optineurin wird die De-Ubiquitinase CYLD an den Rezeptor transportiert und entfernt die Ubiquitinketten von RIP1, woraufhin die NF κ B-Aktivierung beendet wird (rechts). Nach Nagabhushana et al. 2011.

Im Kontext viraler Infektionen tritt Optineurin auch als negativer Regulator der IFN β -Produktion auf, um entzündungsbedingte Schädigungen des Gewebes zu verhindern. Interaktionspartner sind hierbei die Ubiquitin-Ligase TRAF3 und die antivirale Proteinkinase TBK1 (Mankouri et al. 2010). Man kann daher Optineurin als generellen Regulator inflammatorischer Reaktionen deklarieren. Die Unterdrückung der Optineurin-Expression macht nicht nur seine Beteiligung an signalregulatorischen Mechanismen deutlich, sondern zeigt auch seine Einbindung in vesikuläre Transportprozesse. Die Folgen sind eine drastische Veränderung der Morphologie des Golgi-Apparates (Sahlender et al. 2005; Park et al. 2006), die Reduktion vesikulären Transports vom Golgi zur Plasmamembran (Bond et al. 2011) und die verminderte Endocytose des Transferrin-Rezeptors und seines Liganden (Park et al. 2010; Nagabhushana et al. 2010). Die verbindenden Interaktionspartner sind dabei Rab8 und Huntingtin bezüglich endocytotischer Prozesse (Hattula and Peränen 2000) und Myosin VI beim Transport sekretorischer Vesikel zur Zellmembran (Sahlender et al. 2005).

Zielsetzung

Das adenovirale Protein 14.7K ist ein Inhibitor der TNF-induzierten Apoptose. Durch Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Expression von 14.7K sowohl in murinen als auch in humanen Zelllinien die Internalisierung des TNFR1 nach TNF-Stimulation blockiert und die Bindung der pro-apoptotischen Adapterproteine TRADD, FADD und Caspase-8 an die cytoplasmatische Todesdomäne des Rezeptors hemmt. Der diesem Effekt zu Grunde liegende Mechanismus ist aber bislang ungeklärt. Da Optineurin TNF-induziert an den TNFR1-Komplex rekrutiert wird und über diverse Interaktionspartner in vesikuläre Transportprozesse und die Aktivierung des Transkriptionsfaktor NF κ B eingebunden ist, besteht die Möglichkeit, dass die anti-apoptotische Funktion von 14.7K von der Interaktion mit Optineurin abhängt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher die Interaktion von 14.7K mit Optineurin zu charakterisieren und zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen der 14.7K-vermittelten anti-apoptotischen Wirkung und der Interaktion zu Optineurin besteht.

Zu Beginn der Arbeit sollte ein Antikörpers gegen 14.7K hergestellt werden, um die Markierung des Proteins mit einem *Tag* bei der Durchführung der folgenden Versuche vermeiden zu können. Mit Hilfe eines Mammalian Two-hybrid Assay und einer Co-Immunpräzipitation sollten zunächst die Bindungseigenschaften von sequenziellen 14.7K-Mutanten an Optineurin getestet werden. Anschließend sollten die Mutanten auf Protektivität gegenüber TNF-induzierter Apoptose in humanen Zellen durch einen Zytotoxizitätsassay überprüft werden, mit dem Ziel, die Interaktionsfähigkeit mit der TNF-Resistenz korrelieren zu können. Die siRNA-basierte Suppression der Optineurin-Expression sollte zeigen, ob sich der Verlust von Optineurin zum einen in parentalen Zellen auf die TNF-induzierte Apoptose auswirkt, zum anderen, ob er in 14.7K-exprimierenden Zellen zur Aufhebung der Apoptose-Inhibition führt. Die Internalisierung des stimulierten TNFR1 sollte in diesem Zusammenhang ebenfalls untersucht werden. Die Isolierung magnetisch markierter TNFR1-Proteinkomplexe sollte zudem Aufschluss darüber geben, ob 14.7K die Rekrutierung von Optineurin an den Rezeptor verhindert. Da über den TNFR1 neben apoptotischen Prozessen auch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B vermittelt werden kann und Optineurin dabei eine regulatorische Funktion zugeschrieben wird, sollte zusätzlich der Einfluss von 14.7K auf die Aktivierung der an dieser Signalweiterleitung beteiligten Proteine untersucht werden. Die Aktivierung von NF κ B ist durch Transaktivierungsprozesse eng mit der Initialisierung der MAPK-Signalwege verknüpft, weshalb eine funktionelle Überprüfung dieses Signaltransduktionsweges ebenfalls durchgeführt werden sollte.

Letztendlich sollte ein Modell entwickelt werden, welches die Bedeutung der Interaktion von Optineurin mit 14.7K im Rahmen der TNFR1-assoziierten Prozesse erklärt.

2. Material und Methoden

2.1 Molekularbiologie

Die Klonierung sämtlicher DNA-Konstrukte erfolgte unter Anwendung üblicher molekularbiologischer Techniken (Sambrook et al. 2001) Eine detaillierte Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten und erzeugten Konstrukte befindet sich im Anhang.

Die Präparation eines Vektorplasmids wurde durch den Verdau mit entsprechenden **Restriktionsenzymen** gemäß den Herstellerangaben erzeugt, die linearisierte DNA aus einem 1% Agarosegel extrahiert und mit **CIP** dephosphoryliert.

Inserts wurden auf eine der folgenden Arten erzeugt: 1) Direkte Gewinnung aus einem Ausgangsplasmid durch Restriktionsverdau und anschließende Gelextraktion. 2) Generierung durch präparative PCR mit der *proof-reading* Polymerase **Phusion** nach Angabe des Herstellers. Durch Verwendung entsprechender Primer wurden ggf. Schnittstellen angefügt oder Mutationen eingefügt. PCR-Produkte wurden anschließend **T4-PNK** phosphoryliert und über eine *blunt*-Ligation in den Vektor **pBS** subkloniert. Die Ligation erfolgte mit einem fünffachen molaren Überschuss des Inserts und wurde mit der **T4-DNA Ligase** gemäss Herstellerangaben durchgeführt. Der gesamte Ligationsansatz wurde dann zur Transformation chemisch kompetenter Zellen **E.coli DH5α** oder **XL1-Blue** eingesetzt. Nach Anzucht transformierter Bakterien in **LB-Medium** wurde eine Plasmid-Isolierung mit Hilfe eines kommerziellen Kits nach dem Prinzip der alkalischen Lyse durchgeführt. Die Plasmide wurden durch geeignete Kontrollverdaue analysiert, die Inserts der richtigen Größe präparativ verdaut und aufgereinigt, um anschließend wie beschrieben mit dem Zielplasmid ligiert zu werden. Die Korrektheit der Plasmide wurde schließlich durch Sequenzierung bestätigt. Zur Protein-Produktion wurden pQE-Vektoren in den Stamm *E.coli* **M15 [pREP4]** und pGEX-Vektoren in den Stamm *E.coli* **BL21(DE3)** eingebracht. Größere Mengen DNA für die Transfektion von Zellen wurden mit dem **Macherey Nagel Midi-Kit** isoliert, wobei die Reinheit der DNA stets über die UV-Absorption bestimmt wurde ($A_{260} : A_{280}$ -Verhältnis im Bereich von 1,8 - 2,0).

Restriktionsenzyme	New England Biolabs
pBS	Stratagene
CIP	Roche, Nr. 713 023
Gelextraktion	Qiagen, QIAquick Gel Extraction Kit, QIAEX Gel extraction kit
Phusion High Fidelity	New England Biolabs, F-530
T4-PNK	New England Biolabs, M0201
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, M0202
NucleoBond Xtra Midi	Macherey-Nagel, Cat# 740410.50
Easy Prep pro Plasmid Miniprep Kit	Biozym, Cat# 390052
<i>E. coli</i> XL1-Blue	endA1 gyrA96(nal ^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [::Tn10 proAB ⁺ lacI ^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(rk ⁻ mk ⁺)
<i>E. coli</i> M15[pREP4]	Nal ^S Str ^S Rif ^S Thi ⁻ Lac ⁻ Ara ⁺ Gal ⁺ Mtl ⁻ F ⁻ RecA ⁺ Uvr ⁺ Lon ⁺
	Qiagen, Nr. 34210
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	hsdS gal (λcIts857) ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1
LB-Medium	0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) NaCl, pH 7,4

2.1.1 Klonierung der 14.7K Konstrukte

Die Mutanten von 14.7K wurden für die medizinische Doktorarbeit von Alexander Lehn (2006) im Vektor pBS hergestellt und in der vorliegenden Arbeit weiterverwendet. Die jeweiligen Primer zur Herstellung der Mutanten und der detaillierte Prozess der Mutagenese können in der genannten Arbeit nachgesehen werden. Für die entsprechenden hier verwendeten Anwendungen wurden die 14.7K-Varianten in die Vektoren pCMV-AD (EcoRI/XhoI), pQCXIP (BamHI/EcoRI), pQE-30 (BamHI/XhoI) und pGEX-4T3 (BamHI/XhoI) umklont. Die verwendeten Primer befinden sich im Anhang unter 5.2.1.

2.1.2 Klonierung der Optineurin Konstrukte

Für die Optineurin-Konstrukte diente das Plasmid pcDNA3-HA-Optineurin von Dr. S. Ferguson (Robarts Research Institute, London) als Ausgangsplasmid für PCR und Generierung verkürzter Optineurin-Mutanten. Weiterhin wurde Optineurin in die Vektoren pCMV-BD und pQCXIP-HA umklont. Die verwendeten Primer befinden sich im Anhang unter 5.2.1

2.2 Zellbiologie

2.2.1 Zelllinien und Kultivierung

Eukaryotische Zellen wurden nach gängigen Methoden bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

Adhärenz wachsende Zellen wie **HEK293**, **H1299** oder **KB** wurden bei Erreichen einer 90% Konfluenz, ca. alle 2 - 3 Tage, 1 : 8 gesplittet (waschen mit PBS, ablösen mit **Trypsin-EDTA-Lösung**, abstoppen der Trypsin-Reaktion mit DMEM-Vollmedium, Zentrifugation für 2 Min. bei 300·g, resuspendieren des Zellpellets in DMEM-Vollmedium).

HEK293	Ad5-transformierte embryonale Nierenfibroblasten-Zelllinie ATCC-# CRL-1573
H1299	Humane Lungenkarzinom-Zelllinie; ATCC-#CRL-5803
KB-3-1	Humane Cervixkarzinom-Zelllinie (HeLa-Derivat); DSMZ ACC 158
FCS	Verschiedene Chargen von Gibco, Lonza, PAN Biotech Verwendete Chargen wurden zuvor auf gutes Zellwachstum getestet
Pen/Strep	10000 U/ml Pen., 10 mg/ml Strep., PAN Biotech P06-07100
Trypsin-EDTA-Lösung	0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA in PBS, Pan Biotech P10-023500
DMEM-Vollmedium	DMEM (Invitrogen 41966) + 50 ml FCS, 5 ml Pen/Strep

2.2.2 Transfektion von Plasmiden

Für das Einbringen von Plasmid-DNA in HEK293-Zellen wurde die Polyethyleneimin (PEI)-Transfektionsmethode (Godbey, Wu, and Mikos 1999b; Godbey, Wu, and Mikos 1999a) gewählt. Dazu wurden am Vortag 3×10^6 Zellen in 10 ml DMEM-Vollmedium pro 10 cm Kulturschale

ausgesät. Vor der Transfektion wurde das Medium gegen solches ohne FCS und Antibiotika gewechselt. Für 10 µg zu transfizierender DNA wurden 25 µl einer Polyethyleneiminlösung (stock 1 mg/ml) in 1 ml DMEM zusammen mit der DNA für 20 Min. inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Lösung auf die Zellen getropft und durch Schwenken gründlich gemischt. Nach 6 h wurde erneut das Medium gewechselt (Vollmedium).

Polyethyleneimine Polysciences Inc., Cat#24765
10cm Kulturschalen BD, Falcon 353003

2.2.3 Transfektion von siRNA

Zur Transfektion von siRNA wurde das Reagenz **Lipofectamine™ 2000** verwendet und gemäß den Angaben des Herstellers angewandt. Zellen wurden 24 h vor Transfektion mit einer Dichte von mehr als 90 % Konfluenz in einem Well einer **6-Well-Platte** ausgesät, wobei das Medium kein Antibiotikum enthielt. Eine Stunde vor Transfektion wurde das Medium abgezogen und durch 800 µl **Opti-MEM-I+GlutaMax™-I** ohne Zusätze ersetzt. In jeweils 250 µl DMEM wurden 100 pmol der entsprechenden **target-siRNA** und 5 µl Lipofectamine™ 2000 getrennt für 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die beiden Lösungen gemischt und gemeinsam für 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Anschließend wurde das Lipofectamine-siRNA-Gemisch auf die Zellen pipettiert und für 6 h im Brutschrank inkubiert, wobei die 6-Well-Platte alle 30 Min. geschwenkt wurde, um ein gutes Mischverhältnis im Well zu gewährleisten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium abgezogen und durch DMEM mit FCS ersetzt. Zur Kontrolle wurden die Zellen in einem gesonderten Ansatz mit sog. **scramble-siRNA**, d.h. einer siRNA ohne spezifische Zielsequenz, transfiziert, um sicherzustellen, dass die Transfektion mit siRNA allein keinen Effekt auf die Expression des Zielproteins hat. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen mit einer Trypsin-Lösung abgelöst und für nachfolgende Tests verwendet. Die Suppression der Proteinexpression wurde mittels Western Blot überprüft.

Opti-MEM I+ GlutaMax™-I	Invitrogen, Cat#51985
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen, Cat#11668-019
target siRNA Optineurin	ON-TARGETplus SMARTpool L-016269-00-0005, Human OPTN, NM_021980; Thermo Scientific Dharmacon
scramble siRNA	ON-TARGETplus siCONTROL Non-targeting Pool D-001810-10-20; Thermo Scientific Dharmacon
6-Well-Platte	BD, Falcon 35 3047

2.2.4 Zelllysate

Lysate eukaryotischer Zellen wurden für drei Anwendungen hergestellt: 1) Co-Immunpräzipitation HA-markierter Proteine mit HA-Agarose, 2) Analyse transient überexprimierter Proteine, 3) Analyse endogener, z.T. phosphorylierter Proteine.

Dazu wurden zwei Detergens-haltige Puffer verwendet, Lysepuffer **ME**, für nachfolgende Immunpräzipitation mit HA-Agarose, oder **KS-RIPA** für alle anderen Anwendungen. Die Mengenangaben im Folgenden beziehen sich jeweils auf eine 10 cm Kulturschale.

Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Zellen auf Eis zweimal mit 5ml eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden 250 µl Lysepuffer direkt in die Kulturschale pipettiert, die Zellen abgeschabt und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die Zellen wurden im Lysepuffer homogenisiert und 20 Min. auf Eis inkubiert, wobei alle 5 Min. das Lysat erneut durch Invertieren gemischt wurde. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (20 000·g, 15 Min., 4°C) abgetrennt. Abschließend wurde die Proteinkonzentration des Überstands, der die löslichen Proteine enthält, bestimmt. Dazu wurde Lowry-Testreagenz (siehe Proteinbestimmung 2.3.6) verwendet. Die Ausbeuten lagen in der Regel bei ca. 6-8 mg/ml. Der entsprechende Lysepuffer wurde bei Bedarf mit verschiedenen Protease- und Phosphatase-Inhibitoren versetzt.

ME	30 Mm Tris-Cl pH 7,5 , 1 % Triton X-100 ,10 % Glycerol, 120 Mm NaCl
KS-RIPA	50 mM Tris-Cl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 5 mM EDTA, 10 % Glycerol, 10 mM K ₂ HPO ₄
Proteaseinhibitoren	Complete EDTA-free von Roche, 04693132001 40 µl aus 25x stock pro ml vor gebrauch frisch zu zusetzen
Weitere Inhibitoren	Na ₃ VO ₄ (1 mM), NaF (20 mM), PMSF (100 µM), 2-Phosphoglycerat (20 mM), Natrium-Molybdat (1 mM), N-ethylmaleimide (5 mM), Phenanthrolin (1mM), Sigma Aldrich
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,47 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4

2.2.5 Immunpräzipitation

Das Prinzip der Immunpräzipitation beruht auf der spezifischen Erkennung des Zielproteins durch den an eine Matrix gekoppelten Antikörper. Die Matrix besteht meist aus Agarose oder Sepharose, welche mit Protein A oder G gekoppelt ist. Da sowohl Protein A als auch G den Fc-Teil eines Antikörpers bindet, kommt es zu einer Bindung des Antikörpers an die Matrix und somit zur indirekten Bindung des gewünschten Proteins. Da das Matrixmaterial aufgrund seines Gewichtes sedimentiert werden kann, ist es möglich Proteine oder Proteinkomplexe aus einem Zelllysate zu isolieren. Das Lösen der isolierten Proteine von der Matrix erfolgte durch Inkubation in SDS-Probenpuffer bei 95°C. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Matrices verwendet. Die Isolation HA-markierter Proteine erfolgte mit **HA-Agarose**, alle anderen Proteine wurden mit an **Protein G Sepharose** gekoppelten Antikörpern isoliert.

Für die Immunpräzipitation mit HA-Agarose wurden Zellen mit ME-Puffer lysiert und pro Ansatz 1-2 mg Gesamtproteinmenge mit 15 µl HA-Agarose über Nacht bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Am Tag darauf wurde die Agarose fünf Mal mit **IP-Waschpuffer** gewaschen, wobei der Überstand jedes Mal verworfen wurde. Die Sedimentation erfolgte für 2 Min. bei 500-g und 4°C. Nach dem letzten Wasch-Schritt wurde die Agarose mit einer Hamilton-Spritze trockengesaugt und in 50 µl 2x SDS-Probenpuffer für 5 Min. unter leichtem Schütteln bei 95°C inkubiert. Die Agarose wurde ein letztes Mal durch Zentrifugation sedimentiert und der Überstand in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt.

Für die Immunpräzipitation mit Sepharose G wurden die Zellen mit KS-RIPA lysiert und pro Ansatz 1-2 mg Gesamtproteinmenge mit 1-2 µg des entsprechenden Antikörpers über Nacht bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Da Protein G Sepharose in 20 % Ethanol gelagert ist, musste sie vor der Inkubation mit Zelllysate mit KS-RIPA gewaschen werden. Anschließend wurden pro Ansatz 15 µl gewaschene Protein G Sepharose zu dem vorinkubierten Zelllysate pipettiert und weitere 3 h im Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Waschen und Isolation der Proteine von der Sepharose erfolgten wie für HA-Agarose oben beschrieben.

Monoclonal Anti-HA Agarose Conjugate	Clone HA-7, Sigma-Aldrich, Cat# A 2095
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare, Cat# 17-0618-01
IP-Waschpuffer	20mM Tris, 150mM NaCl, 0,05% Triton X-100

2.2.6 Retroviraler Gentransfer: Herstellung stabil exprimierender Zelllinien

Um ein gleichmäßiges und stabiles Niveau an Proteinexpression zu gewährleisten, wurden Zellen mit rekombinanten Retroviren transduziert. Zur Herstellung rekombinanter Retroviren wurde der Vektor **pCL10A1** des **RetroMax™ System** und der Expressionsvektor **pQCXIP** verwendet. Das Plasmid pCL10A1 ist ein sog. Verpackungsvektor, der die Informationen für das virale *gag*, *pol* und *env* trägt. pQCXIP enthält die zu exprimierende DNA, sowie ein Verpackungssignal und ein Resistenzgen gegenüber Puromycin. Die Puromycin-Resistenz bietet die Möglichkeit der Selektion transduzierter Zellen.

Am Vortag in 10 cm-Kulturschalen ausgesäte HEK-293 Zellen (Konfluenz ca. 80 %) wurden mit jeweils 10 µg des Vektors pCL10A1 und pQCXIP transfiziert (siehe Transfektion mit PEI 2.2.2). 48 h nach Transfektion wurden 10 ml des virushaltigen Zellüberstandes der HEK-293 Zellen abgezogen, durch einen 45 µm Filter gedrückt, um Zellreste oder ganze Zellen zu entfernen, und mit **Polybrene** zu einer Endkonzentration von 10 µg/ml gemischt. Polybrene ist ein kationisches Polymer, welches die Abstoßung zwischen Sialinsäuren auf der Zelloberfläche und den Virionen neutralisiert und somit für eine höhere Infektionseffizienz sorgt. Das abgezogene Medium wurde durch frisches ersetzt. Anschließend wurden 2,5 ml des virushaltigen Mediums mit den Zielzellen für 4-5 h inkubiert, welche am Tag vorher in 6-Well-Platten ausgesät worden waren (ca. 5×10^4

Zellen pro Well). Das restliche virushaltige Medium wurde auf Eis gelagert. Nach 4-5 h Inkubationszeit wurde das Medium der Zielzellen abgezogen und durch neues virushaltiges Medium ersetzt. Diese Prozedur der Infektion wurde am folgenden Tag wiederholt. 72 h nach der ersten Infektion wurde das Medium gewechselt und mit der Selektion begonnen. Dazu wurde das Kulturmedium mit 1 µg/ml Puromycin versetzt. In den darauffolgenden Tagen wurde die Puromycinkonzentration alle zwei Tage um 0,5 µg/ml erhöht, bis keine Zellen mehr abstarben und die Zellen der nicht infizierten Kontrolle alle abgestorben waren.

pCL10A1 RetroMax™ System, biomol (Imgenex)
 pQCXIP Clontech, BD biosciences
 Polybrene Sigma-Aldrich
 Puromycin Sigma-Aldrich

2.2.7 Zytotoxizitätsassay

Der Zytotoxizitätsassay dient dazu, die dosisabhängige Toxizität von TNF auf Zellen zu messen und den schützenden Effekt des 14.7K bzw. seiner Mutanten darzustellen. Die Zellen werden dazu mit Cycloheximid behandelt, um die Neusynthese von anti-apoptotischen Proteinen zu unterbinden und so den pro-apoptotischen Weg der TNFR1-Signalkaskade zu forcieren.

Die Zellen wurden in einer Dichte von 3×10^4 Zellen pro Well einer **96-Well-Platte** in Triplets in 100 µl Vollmedium eingesät und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Zu den Zellen wurde anschließend 25 µl einer **Cycloheximid-Lösung** pipettiert. Die verträgliche Konzentration von Cycloheximid ist zelltypspezifisch und liegt für H1299-Zellen bei 12,5 µg/ml und für KB-Zellen bei 2,5 µg/ml. Die erste Reihe (A) enthielt ausschließlich Zellen und Cycloheximid und wurde als unstimulierte Kontrolle verwendet. Die Reihen B bis H wurden mit ansteigenden Konzentrationen von TNF versehen, die zuvor durch eine Verdünnungsreihe hergestellt worden waren. Das Gesamtvolumen pro Well belief sich auf 150 µl.

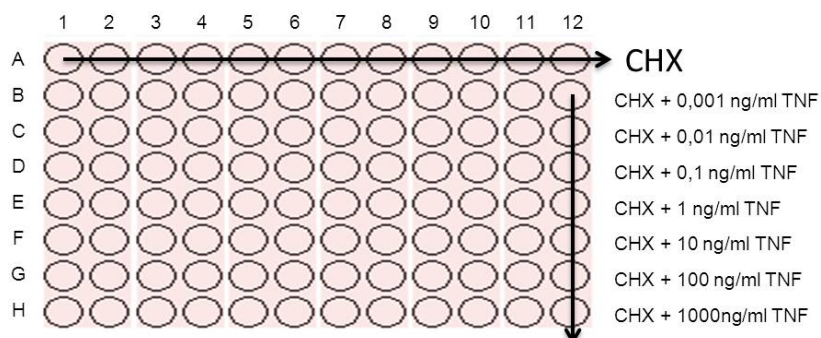


Abb. 2.1 Pipetierschema eines Zytotoxizitätsassay

Nach 16 h Inkubation wurde die 96-Well-Platte durch dreimaliges Eintauchen in PBS und darauffolgendes Ausklopfen gewaschen, wobei nur lebende Zellen im Well haften blieben. Diese wurden mit 50 µl **Kristallviolett-Lösung** pro Well für 15 Min. bei 37°C gefärbt. Die Kristallviolett-Lösung wurde anschließend verworfen und die Platte mit destilliertem Wasser gespült. Für weitere 15 Min. wurde die Platte bei 37°C getrocknet. Abschließend erfolgte das Lösen des Kristallvioletts durch 200 µl einer 33 % Essigsäure unter ständigem Schwenken für 1 Stunde. Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem **Micoplate Reader**. Für die Auswertung wurden die Werte der CHX-Kontrolle als 100 % gesetzt und die Werte der verschiedenen TNF-Konzentration in Abhängigkeit davon berechnet.

Kristallviolett-Lösung	0,5% Kristallviolett, 4% Formaldehyd, 30% Ethanol, 30mM NaCl
96-Well-Platte	BD, Falcon 35 3072
Cycloheximid	Sigma Aldrich, 5µg/µl stock
Microplate Reader	Microplate Reader Model 680, BIO-RAD
Humanes TNF	Knoll AG

2.2.8 Isolierung magnetisch markierter Vesikel

Zellen aus vier konfluent bewachsenen 175 cm² Kulturflaschen wurden am Vortag des Versuchs trypsinisiert und über Nacht in einem Falcon mit 50 ml Vollmedium inkubiert. Grund dafür war, dass der Vorgang des Trypsinierens sich negativ auf den an der Zelloberfläche befindlichen TNFR1 auswirken könnte. Durch die Inkubation im Falcon wurde den Zellen die Möglichkeit gegeben, den Rezeptor an der Zelloberfläche wieder zu regenerieren. Am Folgetag wurden die Zellen durch mikroskopieren nach einer Trypanblau-Färbung auf ihre Vitalität hin untersucht. Es wurde sichergestellt, dass mehr als 90 % der Zellen lebendig waren. Die Zellen wurden anschließend bei 300-g pelletiert und der Überstand verworfen. Um Reste des Vollmediums zu entfernen, wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und ein weiteres Mal pelletiert. Das Pellet wurde anschließend 10 Min. auf Eis inkubiert und dann mit 200 ng **Biotin-TNF** gemischt, um die TNF-Rezeptoren zu beladen. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde auf Eis wurden dem Pellet 200 µl **Streptavidin Microbeads** zugefügt, sanft gemischt und eine weitere Stunde auf Eis inkubiert. Die Internalisierung des beladenen TNFR1 wurde durch Zugabe von 20 ml vorgewärmten DMEM gestartet und das Falcon für die gewünschte Zeit weiter im 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Das Abstoppen der Internalisierung erfolgte durch Zugabe von 30 ml eiskaltem DMEM und sofortiges Abzentrifugieren mit 300-g bei 4°C. Anschließend wurde das Pellet erst mit eiskaltem PBS, dann mit **Homogenisationspuffer** gewaschen und letztendlich in einem Gesamtvolumen von 800 µl in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die Zellen wurden ein weiteres Mal auf ihre Vitalität hin geprüft. Um die Zerstörung des Cytoskeletts durch Ultraschall zu erleichtern, wurden die Zellen mit 10 µg **Cytochalasin D** für 15 Min. auf Eis inkubiert. Außerdem wurde **Benzonase** zugefügt, um genomische DNA abzubauen. Die Zellen wurden für 2 Min. im

Ultraschallbad beschallt und dann zentrifugiert, um noch intakte Zellen zu pelletieren. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und das Rest-Pellet nochmals beschallt und zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt und nochmals zentrifugiert. Ein Aliquot des so erhaltenen Lysats wurde zur Proteinbestimmung und Analyse in SDS-PAGE und Western Blot abgenommen, der Rest für 3 h zur Isolierung der magnetischen Fraktion auf eine *Free-Flow*-Magnetkammer (Tchikov and Schütze 2008) geladen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde mit Homogenisationspuffer für 45 Min. gespült, wobei die Flussgeschwindigkeit 150 µl/min betrug. Die magnetische Fraktion wurde in ca. 1 ml Homogenisationspuffer von der Magnetkammer eluiert und für 45 Min. bei 4°C und 20.000·g zentrifugiert. Das Pellet wurde in einer 0,1 % SDS-Lösung resuspendiert und der Proteingehalt mittels Lowry Assay bestimmt. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot. Um Lysat und magnetische Fraktion vergleichen zu können, wurden jeweils gleiche Proteinmengen des Lysats und der magnetischen Fraktion aufgetragen.

Biotin-TNF	Flourokinine rh TNF α/TNFSF2 Biotin , R&D Systems, Cat# NFTA0
Benzonase	Novagen, Cat# 70664-3
Cytochalasin D	Merck, Cat# 250255-1MG
Homogenisationspuffer	0,25 M Sucrose, 15 mM HEPES, 0,5 mM MgCl ₂ , pH 7,4
Streptavidin Microbeads	Milteny Biotec, Cat# 130-048-101
Ultraschallgerät	Branson Sonifier 450, Output 20, Constant Duty Cycle
Pumpe	Gilson, Minipuls 3

2.2.9 Mammalian Two- Hybrid Assay

Der **Mammalian Two-Hybrid Assay** dient zur Überprüfung von Protein-Protein-Interaktionen in Säugerzellen. Die Detektion der Protein-Interaktion erfolgt über die Aktivierung einer Reporter-gen-Expression. Hierbei wird auf dem Reporterplasmid pFR-Luc ein Luciferase-Gen über einen Promotor, der einen fünffachen *repeat* einer GAL4-Bindedomäne der Hefe enthält, kontrolliert. Die zwei zu testenden Proteine werden mit Hilfe zweier Expressionsplasmide entweder mit einer Aktivierungsdomäne (pCMV-AD) oder mit einer Bindedomäne (pCMV-BD) fusioniert. Findet eine Assoziation der Proteine statt, wird ein funktionsfähiger Transkriptionsfaktor gebildet, der an die GAL4-Bindedomäne des Luciferase-Promotors bindet und somit die Expression der Luciferase startet.

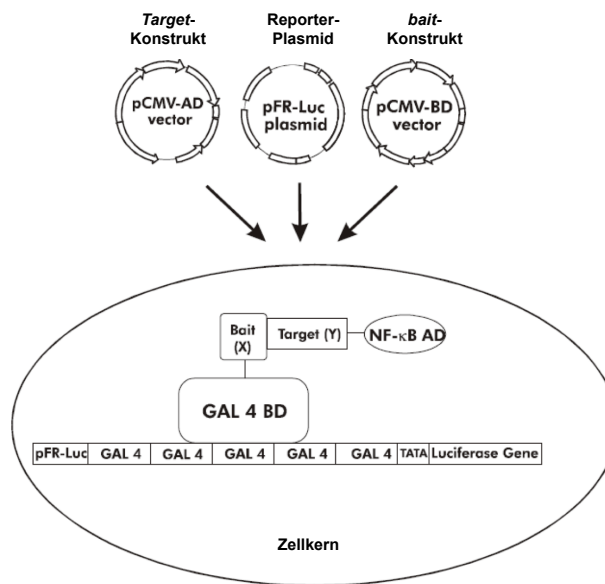


Abb. 2.2 Schema des Mammalian Two-Hybrid assay. Verändert nach Stratagene, Manual Mammalian Two-Hybrid assay Kit

Die Durchführung des Mammalian Two-Hybrid Assay fand in 6-Well-Format statt. Für die Transfektion der Plasmide wurde Lipofectamine™ 2000 (siehe 2.2.3) verwendet. 4×10^5 HEK-293-Zellen wurden in ein Well einer 6-Well-Platte in Vollmedium ohne Antibiotika ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen nach folgendem Schema mit Lipofectamine™ 2000 transfiziert:

Tabelle 2.1 Pipettierschema für den Mammalian two-Hybrid Assay

Plasmid	pCMV-AD	pCMV-BD	pFR-Luc	pRL-TK
Menge	200 ng	200 ng	1200 ng	200 ng

Das Plasmid **pRL-TK** dient zur Expression einer zweiten Luciferase (*Renilla*), welche als Transfektionskontrolle verwendet wird. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und in 200 µl Lysepuffer (Bestandteil des **Dual-Luciferase Reporter Assay**) mit einem Zellschaber abgekratzt. Das Lysat wurde 15 min bei -80°C eingefroren, anschließend im Wasserbad (RT) aufgetaut und 10 min bei RT geschüttelt. Danach wurde das Lysat für 5 min bei 4°C mit 20.000-g abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. 5 µl des Lysats wurden anschließend mit Hilfe des Dual-Luciferase Reporter Assay System in einem Luminometer vermessen. Die Messzeit betrug 10 Sekunden. Die relative Luciferaseaktivität berechnet sich aus dem Verhältnis von Reporter-Luciferase *Firefly* zu Transfektionskontrolle-Luciferase *Renilla*.

Luminometer Lumat LB 9501, berthold
Mammalian Two-Hybrid Assay Kit Stratagene, Cat#21344
Dual-Luciferase Reporter Assay System Promega, Cat# E1910
pRL-TK Promega, Cat# E2241

2.2.10 Biotin-TNF Internalisierungsassay

Für den Biotin-TNF Internalisierungsassay wurden Komponenten des **rhTNF α /TNFSF2 Biotin Fluorokine® Kit** verwendet.

Am Vortag wurden 8×10^4 Zellen pro Well einer 6-Well-Platte auf einem **Deckgläschen** ausgesät. Für die Behandlung eines Deckgläschens wurden 1,25 μ l **Biotin-TNF** mit 1,25 μ l **Streptavidin-FITC** gemischt und eine Stunde bei RT im Dunkeln inkubiert, um eine Bindung des Streptavidin an das Biotin zu ermöglichen. Anschließend wurde der Ansatz mit PBS auf ein Volumen von 50 μ l aufgefüllt und auf einen Parafilm getropft. Die bewachsene Seite des Deckgläschens wurde nun, nachdem es mit PBS gewaschen wurde, in den Tropfen gelegt und für eine Stunde bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Bei diesem Schritt sollte sich das Biotin-TNF/Streptavidin-FITC-Konjugat an den TNFR1 an der Zelloberfläche anlagern. Ungebundenes TNF wurde durch Eintauchen der Deckgläschen in PBS gewegewaschen. Es folgte eine weitere Stunde Inkubation bei 37°C im Brutschrank. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde dreimal mit kaltem PBS gewaschen und die Zellen anschließend mit 2 % Paraformaldehyd für 15 Min. fixiert. Anschließend wurden die Zellen 10 Min. mit einer 0,1 % Triton X-100 Lösung behandelt, um die Zellmembranen für das **Mounting Medium** permeabel zu machen, mit dem sie abschließend auf einem Objektträger eingebettet wurden. Über Nacht konnte das Mounting Medium bei 4°C im Kühlschrank aushärten. Die Probe konnte am darauf folgenden Tag mittels **Konfokalmikroskopie** untersucht werden.

Biotin-TNF	rhTNF α /TNFSF2 Biotin Fluorokine® Kit, R&D, Cat# NFTA0
Streptavidin-FITC	rhTNF α /TNFSF2 Biotin Fluorokine® Kit, R&D, Cat# NFTA0
Deckgläschen	Human Fibronectin Cellware (2 mm round Coverslips), BD BioCoat, Cat#354088
Mounting Medium	Vectashield Mounting Medium with DAPI, LINARIS, Cat#H-1500
Konfokales Mikroskop	LSM 510 META, Zeiss

2.2.11 Fluorimetrische Bestimmung der Caspase-8-Aktivität

Für die Bestimmung der Caspase-8-Aktivität wurden Zellen am Vortag in **15 cm-Kulturschalen** eingesät, so dass sie am darauf folgenden Tag eine Dichte von 80-90 % Konfluenz aufwiesen. Vor der Stimulation mit 100 ng/ml TNF wurden die Zellen für eine Stunde mit Cycloheximid vorbehandelt. Dies geschah, um die Neusynthese anti-apoptotischer Proteine zu hemmen. Für H1299-Zellen wurde eine Konzentration von 12,5 μ g/ml gewählt, für KB-Zellen 2,5 μ g/ml. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen, die nur mit Cycloheximid behandelt wurden. Die Stimulation mit TNF erfolgte für 5 h im Brutschrank. Für die Zellernte wurden die Zellen in ihrem Kulturmedium abgeschabt und in 50 ml-Röhrchen gesammelt. Die Zellen wurden für 8 Min. bei 500·g und 4°C pelletiert und zweimal mit 50 ml kaltem PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 2 ml PBS aufgenommen, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und ein letztes Mal zentrifugiert. Die pelletierten

Zellen wurden bei - 80°C bis zur Lyse eingefroren. Für die Lyse wurde das Pellet in 500-700 µl **Lysepuffer C** resuspendiert und 10 Min. bei 4°C bei 1000 rpm im Eppendorf Thermomixer geschüttelt und anschließend bei 20.000·g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand entsprach dem Lysat und wurde in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Mit dem restlichen Pellet wurde die Prozedur wiederholt und das Lysat mit dem ersten vereinigt. Es folgte eine Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Lowry-Test. Da eine zu hohe DTT-Konzentration bei der Proteinkonzentrationsbestimmung gestört hätte, wurde das Lysat erst danach auf eine Endkonzentration von 5 mM DTT gebracht, aliquotiert und bei - 80°C bis zur Messung der Caspase-Aktivität gelagert.

Für die fluorimetrische Messung der Caspase-Aktivität wurde jeweils 100 µg Protein eingesetzt und der Versuch nach unten stehenden Pipettierschema in 96-Well-Platten angesetzt. Es wurden pro Test jeweils Triplets vermessen. Die Aktivität der Caspase-8 wurde durch die Umsetzung eines entsprechenden **Substrats** (Acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp7-amido-4-methyl-coumarin, Ac-IETD-AMC) gemessen. Bei der Umsetzung wurde ein Fluorophor (AMC) freigesetzt, der mit einer Wellenlänge von 350 nm zu einer Emission bei 480 nm angeregt werden konnte

(Ac-IETD-AMC → Ac-IETD + AMC). Die Detektion erfolgte alle 5 Min. für eine Messzeit von 145 Min. Die erhaltenen Werte wurden als Kurve in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Die Steigung der Kurve gibt die relative Menge des entstandenen Lichts (*relative Light Unit*, RLU) pro Minute (RLU/min) an. Anhand der Steigung einer Eichgeraden wurde ermittelt, wieviel pmol AMC welcher relativen Lichtmenge entspricht. Somit konnte durch das Verhältnis aus der Steigung der Messgeraden (RLU/min) zu der Steigung der Eichgeraden (RLU/pmol AMC) der Umsatz von AMC in pmol/min berechnet werden. Der Umsatz pmol AMC/min der einzelnen Proben wurde anschließend auf den Wert für die unstimulierte, nur mit CHX-behandelte Probe normalisiert.

Berechnung der Caspase-Aktivität in pmol/min:

$$\frac{m_{\text{Caspase-Aktivität}} (\text{RLU/min})}{m_{\text{Eichgerade}} (\text{RLU/pmol AMC})} = x_{\text{Caspase-Aktivität}} (\text{pmol/min})$$

Normalisierung auf die unstimulierte CHX-Kontrolle:

$$y = \frac{x_{\text{Caspase-Aktivität}} (\text{pmol/min})}{x_{\text{CHX-Kontrolle}} (\text{pmol/min})}$$

m= Steigung, x= Caspase-Aktivität in pmol/min, y= Faktor, der das Verhältnis der stimulierten Probe zur unstimulierten CHX-Kontrolle wiedergibt.

Tabelle 2.2 Pipettierschema des Caspase-Aktivitätsassay

Ansatz 1	100 µl 2x Assaypuffer 90 µl (100µg) Proteinlysate (CHX, TNF) 10 µl Caspase Substrat
Ansatz 2	100 µl 2x Assaypuffer 2 µl ZVAD-FMK 90 µl (100µg) Proteinlysate (CHX, TNF) 10 µl Caspase Substrat
Ansatz 3	100 µl 2x Assaypuffer 90 µl (100µg) Proteinlysate (CHX) 10 µl Caspase Substrat
Ansatz 4	100 µl 2x Assaypuffer 2 µl ZVAD-FMK 90 µl (100µg) Proteinlysate (CHX) 10 µl Caspase Substrat
Ansatz 5	100 µl 2x Assaypuffer 90 µl Positivkontrolle 10 µl Caspase Substrat
Ansatz 6 Positivkontrolle	100 µl 2x Assaypuffer 2 µl ZVAD-FMK 90 µl Positivkontrolle 10 µl Caspase Substrat
Ansatz 7 Blank	100 µl 2x Assaypuffer 90 µl Lysepuffer 10 µl Caspase Substrat

Rekombinante Caspase-8	Caspase-8 (h)(rec.)(active), Enzo Life Sciences, Cat# ALX-201-062-U100
Caspase-Inhibitor	Z-VAD(OMe)-FMK, Enzo Life Sciences, Cat# BML-P416-0001
Substrat Caspase-8	Ac-IETD-AMC [Granzyme B Sub./Casp.-8/Casp.-3 Proc.Subs.(AMC)], Enzo Life Sciences, Cat# ALX-260-042-M005
2x Assaypuffer	50mM HEPES (pH 7,4), 200 mM NaCl, 0,1% CHAPS, 1,9 mM EDTA, 20% (v/v) Glycerin, 15mM DTT
Lysepuffer C	50 mM HEPES (pH 7,4), 0,1 % CHAPS, 0,1 % NP 40, 0,1 mM EDTA, 1mM DTT , Lysate später auf 5mM einstellen
15 cm Kulturschale	BD, Falcon, Cat# 353025
96-Well-Platten	96F Maxisorp, nunc TM Cat# 436110
Victor ³ TM	Perkin Elmer, Multilabel Counter 1420

2.2.12 Fluoreszenzmikroskopische Analysen

Die Analyse apoptotischer Merkmale an Zellkernen (Kondensation von Chromatin) wurde durch Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Dazu wurden die Zellen (H1299 und KB) in einer Dichte von 1×10^5 auf ein Deckgläschen in ein Well einer 6-Well-Platte eingesät und am Folgetag für 16 h bzw. 7 h mit Cycloheximid allein oder zusammen mit TNF in den Konzentrationen von 1 ng/ml und 10 ng/ml inkubiert. Die Deckgläschen wurden anschließend vorsichtig dreimal mit kaltem PBS gewaschen, mit Paraformaldehyd fixiert und auf Objektträgern mit *Mounting Medium* eingebettet

(siehe 2.2.10). Da das *Mounting Medium* den Farbstoff DAPI enthielt, konnte im **Fluoreszenzmikroskop** die Kernstruktur der Zellen untersucht werden.

Für die **Immunfluoreszenz**, wie sie zum Testen des Antikörpers gegen das adenovirale 14.7K verwendet wurde, wurden parentale KB- und 14.7K wt-exprimierende Zellen ebenfalls in einer Dichte von 1×10^5 auf ein Deckgläschen in ein Well eingesät. Am Folgetag wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und mit 2 % Paraformaldehyd (pH 7,5) für 10 min fixiert. Das Paraformaldehyd wurde abgesaugt und die Zellen nochmals mit PBS gewaschen, um verbliebene Reste von Paraformaldehyd zu entfernen. Um die Zellwände für die Antikörper durchlässig zu machen, wurden die Zellen mit 0,1 % Triton in PBS für 15 Min. inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die unspezifischen Bindungsstellen 1 h mit 1% BSA in PBS blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper. Dazu wurden 50 µl einer Verdünnung des Antikörpers in 1 % BSA/PBS auf einen Parafilm getropft, das Deckgläschen vorsichtig mit der bewachsenen Seite in den Tropfen gelegt und über Nacht in einer geschlossenen Dose inkubiert. Die darauf folgenden Waschschrte, dreimal 5 Min. mit PBS, erfolgten wieder im 6-Well, bevor das Deckgläschen mit dem Zweitantikörper inkubiert werden konnte. Dafür wurde ein Tropfen von 100 µl der Zweitantikörper-Lösung erneut auf einen Parafilm getropft, das Deckgläschen mit der bewachsenen Seite hineingelegt und für 2 h in inkubiert. Das Deckgläschen wurde anschließend nochmals gewaschen, um nach vorsichtigem Abtupfen auf Zellstoff, auf einem gereinigten Objektträger eingebettet zu werden. Dazu wurde das Deckgläschen mit der bewachsenen Seite in 20 µl *Mounting Medium* (siehe 2.2.10) gelegt und vorsichtig zwischen zwei Schichten Zellstoff von überschüssigem *Mounting Medium* durch sanftes Überstreichen befreit. Über Nacht härtete das *Mounting Medium* bei 4°C im Kühlschrank aus.

Tabelle 2.2 Übersicht Immunfluoreszenz-Antikörper

Primär-Antikörper			Sekundär-Antikörper		
Name	Hersteller, Bestell-Nr.	Verdünnung (in PBS mit 1% BSA)	Name	Hersteller, Bestell-Nr.	Verdünnung (in PBS mit 1% BSA)
α -14.7K	Immunoglobine GmbH	1/100	Goat α -rabbit Alexa 546	Invitrogen, A11010	1/500
			Phalloidin-FITC		1/1000

Fluoreszenzmikroskop DMRX, Leica, Objektiv HCX PL APO, 63x/1,40, 0,6 OIL, $\infty/0,17$ IE
Software Image Pro 2.6

2.3 Proteinbiochemie

2.3.1 Protein-Expression in *E. coli*

Die Produktion von GST-Fusionsproteinen erfolgte mit dem pGEX4T3-Vektorsystem (GE Healthcare) im Bakterienstamm BL21(DE3), die Produktion von His-Fusionsproteinen mit dem pQE30-Vektorsystem (Qiagen) im Stamm M15[pREP4].

Ein 200 ml Kulturvolumen wurde aus einer über Nacht-Kultur der jeweiligen Bakterien angeimpft und bei 37°C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 geschüttelt. Die Expression des Zielproteins wurde durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C und 220 rpm wurde die Kultur für 15 Min. bei 6000·g und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet wie unter 2.3.2 bzw. 2.3.3 beschrieben weiterverarbeitet.

2.3.2 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Da das Protein nach seiner Expression in sog. *Inclusion Bodies* vorlag, wurde ein Protokoll zur Aufreinigung von *Inclusion Bodies* angewandt. Das Protokoll wurde von der Firma immunoGlobe Antikörpertechnik GmbH zur Verfügung gestellt (modifiziert aus Nagai K & Thogersen HC (1987) Synthesis and sequence-specific proteolysis of hybrid proteins produced in *Escherichia coli*. Methods Enzymol.153:461-81.)

Zur Lyse wurde das Bakterienpellet (siehe 2.3.1) in 10,6 ml **Lysepuffer IGL** resuspendiert und nach Zugabe von 26,6 mg Lysozym für 30 Min. auf Eis inkubiert. Es folgte eine Ultraschallbehandlung auf Eis für 10 Min. Anschließend wurden 26,6 ml **Detergent-Puffer** zugegeben, das Lysat für 10 Min. bei 6000·g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 33,3 ml **Waschpuffer** resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde mehrere Male wiederholt. Der letzte Wasch-Schritt erfolgte mit 33,3 ml 70 % Ethanol. Das Pellet konnte in 1ml PBS aufgenommen werden und wurde nochmals mit Ultraschall behandelt. Zur vollständigen Homogenisierung wurde das Lysat mehrfach durch eine Spritze (Nadel 22G) gezogen. Die Reinheit der isolierten Proteinfraction wurde mittels Coomassie-Gel bestimmt.

IGL	50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,25% Sucrose, 1mM EDTA
Detergent-Puffer	20mM TrisCL, pH7,5, 2mM EDTA, 200 mM NaCl, 1% Deoxycholic Acid, 1% Triton X-100
Waschpuffer	0,5% Triton X 100, 1mM EDTA

2.3.3 Aufreinigung von His-Fusionsproteinen

Die Aufreinigung von His-Fusionsproteinen erfolgte mit Hilfe des **Protino Protein Purification System Ni-IDA 2000**. Es wurde den Angaben des Herstellers gefolgt. Zur Umpufferung des Proteins von Elutionspuffer in PBS wurde eine Dialyse durchgeführt.

Dialyseschlauch Roth, Spectra/Por 4, Grössenausschluss 12 - 14 kDa
Protino Ni-IDA 2000 Macherey-Nagel, Cat# 745 170.5

2.3.4 Proteinfractionierung mittels Prep Cell

Um die His-14.7K Proteinfraction von unerwünschten Nebenbanden zu reinigen, wurde eine Proteinfractionierung mittels **Prep Cell** durchgeführt. Die Prep Cell wurde mit einem 15 % SDS-Trenngel beladen und die Elektrophorese für 8 h durchgeführt. Dabei wurden 30 Fraktionen gesammelt, wobei die ersten 17 Fraktionen später durch Coomassie- oder Silberfärbung auf ihre Reinheit hin überprüft wurden.

Prep Cell Mini Prep Cell, Model 491, Bio-Rad, # 170-2908

2.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach dem Lowry-Prinzip mit dem Bio-Rad **DC Protein Assay**. 25 µl in H₂O verdünnte Proteinlösung wurden mit 150 µl Reagenz A und 1 ml Reagenz B gemischt, 10 Min. bei RT inkubiert und die Absorption bei 750 nm gemessen. Als Standard diente stets eine BSA-Verdünnungsreihe (0, 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11 µg/ml); der Korrelationskoeffizient R^2 der Ausgleichsgeraden war stets > 0,98.

Lowry Testreagenz DC Protein Assay, Reagent A, Cat# 500-0113, BIO-RAD
DC Protein Assay, Reagent B, Cat# 500-0114, BIO-RAD

2.3.6 SDS-PAGE

SDS-PAGE-Analysen (Laemmli 1970) wurden mit dem Mini Protean® System von Bio-Rad entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Elektrophorese wurde mit 200 V und 25 mA für ca. 1 h mit **SDS-Laufpuffer** durchgeführt. Je nach erwünschtem Auftrennungsbereich wurden 0,75 mm dicke Mini-Gele mit 10, 12,5 oder 15 % Acrylamid eingesetzt, als Standard diente stets ein **PageRuler™**. Proben wurden mit **SDS-PAGE-Ladepuffer** versetzt, vor dem Auftragen 5 Min. auf 95°C erhitzt und 1 Min. bei 20.000·g und RT zentrifugiert.

Zur Coomassie-Färbung wurden die Gele nach dem Lauf direkt in **Coomassie-Färbelösung** überführt, 30 Min. geschüttelt und anschließend mit **Entfärbe-Lösung** über Nacht entfärbt. Die

Silberfärbung erfolgte gemäß Herstellerangaben. Anschließend wurde das Gel auf **Whatman-Papier** in einem **Geltrockner** für 2 h bei 75°C getrocknet.

2x SDS-PAGE-Ladepuffer	125 mM Tris, 2 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 1 mM EDTA, 10 % (w/v) Glycerin, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8
SDS-Laufpuffer	144g Glycin (192mM), 30,g Tris (250mM), 10g SDS (1%) ad 1L bidest H ₂ O
PageRuler	PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas, Cat#1811; Größen 250,130,95,72,55,36,28,17,10 kDa
Coomassie-Färbelösung	0,125 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 50 % (v/v) Ethanol, 7 % (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung	7 % (v/v) Essigsäure
Silberfärbung	Deep Silver Kit, Mo Bi Tec, Cat# SS001
Whatman	Chromatography Paper, 3mm Chr, Whatman, Cat# 3030917
Geltrockner	Drystar, H.Hözl GmbH

2.3.6 Western-Blot-Analyse

Gele wurden nach der SDS-PAGE (siehe 2.3.6) im Wet-Blot-Verfahren mit folgendem Aufbau geblottet:

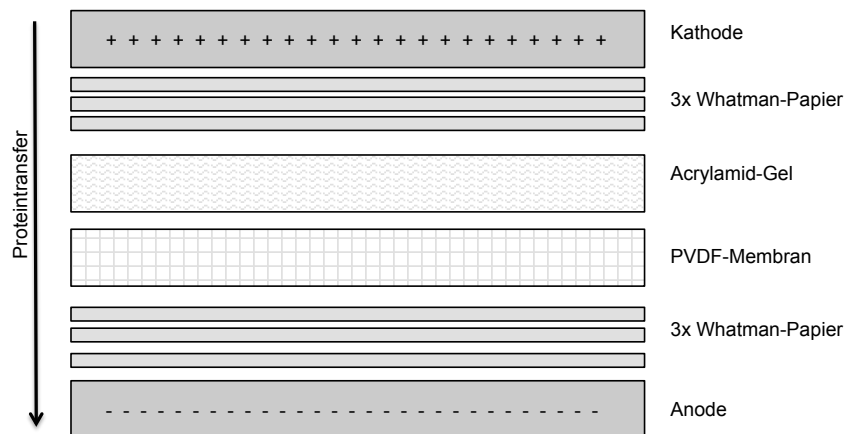


Abb.2.3 Schematischer Aufbau der Western Blot-Apparatur

Der Transfer wurde bei 350 mA und 150 V für 40 Min. durchgeführt. Nach dem Blot wurde die **Membran** in 5 % Magermilchpulver-Lösung in **TBS** für 1h blockiert.

Die Western-Blot-Analyse wurde dann nach folgendem Schema durchgeführt:

- Waschen: 3x mit je 25 ml TBS/T, 10 Min. schütteln bei RT
- Primär-Antikörper: 5 ml Antikörper-Lösung (siehe Tabelle 2.3), ÜN bei 4°C
- Waschen: 3x mit je 25 ml TBS/T, 10 Min. schütteln bei RT
- Sekundär-Antikörper: 5 ml Antikörper-Lösung (siehe Tabelle 2.3), 1 h bei RT
- Waschen: 3x mit je 25 ml TBS, 10 Min. schütteln bei RT
- Entwickeln: Zugabe von 2 ml **Substrat-Lösung**, 2 Min. bei RT
- Detektion: CCD-Kamera-Aufnahme, **Intas Chemilux Pro**

Tabelle 2.3 Übersicht über die verwendeten Antikörper im Western Blot

Primär-Antikörper			Sekundär-Antikörper		
Name	Hersteller, Bestell-Nr.	Verdünnung (in TBS mit 5% BSA)	Name	Hersteller, Bestell-Nr.	Verdünnung (1% Milchpulver in TBS)
α -Nemo (IKK γ)	Cell Signaling, #2685	1/500	Goat α -rabbit HRP-conjugate	BioRad, #172-1019	1/20.000
α -phospho IKK γ	Cell Signaling, #2689				
α -Optineurin	Cayman Chemicals, ABIN 110204				
α -TNFR1	Cell Signaling, #3736				
α -I κ B α	Cell Signaling, #4812				
α -Phospho-I κ B α	Cell Signaling, #2859				
α -JNK	Cell Signaling, #9258				
α -phospho-JNK	Cell Signaling, #9251				
α -p38	Cell Signaling, #9212				
α -Phospho-p38	Cell Signaling, #9211				
α -Caspase-8	Cell Signaling, #9746				
α -14.7K	ImmunoGlobe GmbH				
α -p65	Cell Signaling, #3034				
α -Phospho p65	Cell Signaling, #3039				
α -Erk	Cell Signaling, #4695				
α -Phospho Erk	Cell Signaling, #4370				
α -HA	Dianova, DLN-12262				
α -Tubulin	Santa Cruz Biotechnologie, sc-9104	1/1000	Goat α -mouse HRP-conjugate	BioRad, #1706516	1/3000
α -RIP1	BD Transduction Laboratories, #610459				
α -TRAF 2	BD Transduction Laboratories, #558890				
α -Clathrin	BD Transduction Laboratories, #610499				

Western-Transferpuffer 25 mM Tris, 150 mM Glycin, 10 % (v/v) Methanol
 PVDF Membran Westran CS, 0,45 μ m, Hartenstein, Cat# PVD4
 Whatman Papier Millipore, Cat# 10401196
 Blocking-Puffer 5 % Magermilchpulver in TBS
 TBS 150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 7,4
 TBS/T TBS mit 0,1 % (v/v) Tween-20
 Substrat-Lösung SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce 34077
 SuperSignal West Dura Chemiluminescent Substrate, Pierce 34076

3. Ergebnisse

3.1 Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen 14.7K

Für das adenovirale Protein E3-14.7K (im Folgenden kurz „14.7K“) gibt es keinen kommerziell erwerblichen Antikörper, weshalb gemeinsam mit der Firma immunoGlobe GmbH (Himmelstadt) ein polyklonaler Antikörper hergestellt wurde. Dazu wurde sowohl GST-14.7K (2.3.2) als auch His-14.7K (2.3.3) als Fusionsprotein rekombinant produziert und aufgereinigt, wobei GST-14.7K zur Immunisierung des Kaninchens diente, His-14.7K zur späteren Reinigung des Antikörpers aus dem Serum. Immunisierung und Aufreinigung des Antikörpers wurden von der Firma immunoGlobe GmbH übernommen, die schließlich den polyklonalen Antikörper in einer Konzentration von 120 µg/ml in PBS (0,02 % NaN₃, 1 mg/ml BSA) lieferte. Der Antikörper wurde auf seine Spezifität hin in Immunpräzipitation, Western Blot und Immunfluoreszenz getestet.

3.1.1 Aufreinigung von GST-14.7K und His-14.7K

Das Kaninchen wurde mit rekombinant in Bakterien hergestelltem GST-14.7K immunisiert. Für die rekombinante Produktion in *E.coli* wurde 14.7K in den prokaryotischen Expressionsvektor pGEX-4T3 (siehe 5.2.3) kloniert, so dass das Protein N-terminal mit einem GST-Tag fusioniert wurde. GST-14.7K wurde dann wie beschrieben (2.3.2) in *E.coli* exprimiert.

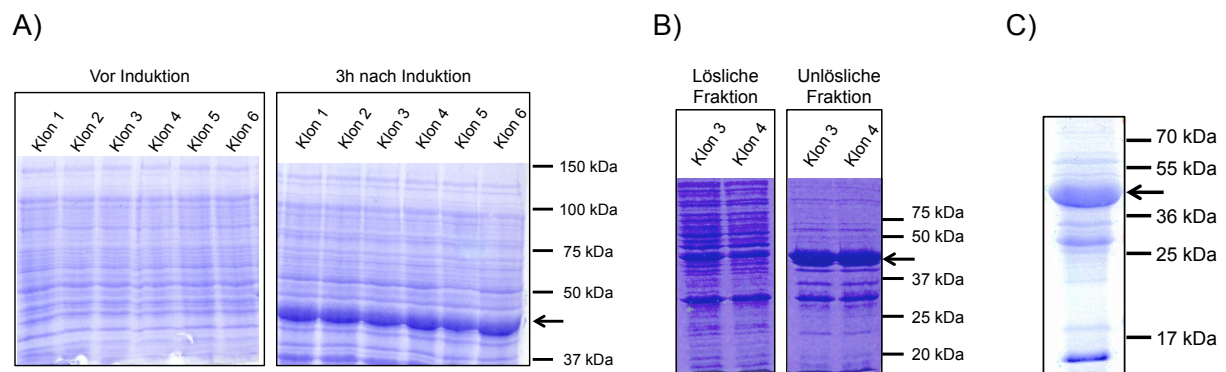


Abb. 3.1 Expression und Reinigung von GST-14.7K in BL21 (DE3)

A) Bakterien vom Stamm *E.coli* BL21(DE3) wurden mit pGEX 4T3–14.7K wt transformiert und die Expression von GST-14.7K wt mit IPTG in sechs Klonen für 3 h induziert. Entnommene Aliquots vor und nach Induktion wurden per SDS-PAGE/Coomassie-Färbung analysiert.

B) Die Expressionskulturen von Klon 3 und Klon 4 wurden durch Inkubation mit Lysozym und Ultraschallbehandlung lysiert und durch Zentrifugation in lösliche und unlösliche Fraktion getrennt. Aliquots der jeweiligen Fraktion wurden mittels SDS-PAGE/Coomassie-Färbung analysiert.

C) GST-14.7K wurde aus der unlöslichen Fraktion der Expressionskultur von Klon 4 gereinigt, indem mehrere Waschschrte mit einem 0,5 % Triton X-100-haltigem Waschpuffer erfolgten. Ein Aliquot der gereinigten Fraktion wurde durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Die GST-14.7K-Bande ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Als erstes wurde die Expression des Fusionsproteins in sechs verschiedenen Bakterien-Klonen überprüft (Abb. 3.1A), wobei Aliquots der Bakterienkultur vor und 3 h nach Expressionsinduktion durch IPTG entnommen wurden. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung analysiert. Wie man der Abbildung entnehmen kann, wurde GST-14.7K 3 h nach IPTG-Zugabe in allen Klonen in etwa gleicher Menge produziert.

Aus diesen sechs Klonen wurden zwei Klone ausgewählt, um die Löslichkeit des Proteins zu bestimmen. Die jeweiligen Expressionskulturen wurden nach Behandlung mit Lysozym und Ultraschall durch Zentrifugation in lösliche und unlösliche Fraktion getrennt. Aliquots beider Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung auf Gehalt des Fusionsproteins überprüft. Wie der Abbildung 3.1B entnehmen werden kann, befand sich der Hauptanteil des rekombinanten GST-14.7K in der unlöslichen Fraktion beider Expressionskulturen. Bei der Expression rekombinanter Proteine in *E.coli* kann es in den Zellen zu unphysiologischen, hohen Konzentration der synthetisierten Proteine kommen, die von den Zellen dann in sog. *inclusion bodies* (Einschlusskörperchen) deponiert werden und somit unlöslich sind. Es gelang nicht, den Anteil des löslichen Fusionsproteins durch veränderte Kulturbedingungen (Anzuchttemperatur, Bakteriendichte, Expressionsdauer) zu erhöhen. Letztendlich wurde die Expressionskultur von Klon 4 gewählt, um GST-14.7K aus der unlöslichen Fraktion unter denaturierenden Bedingungen aufzureinigen. Dazu wurde das Pellet der unlöslichen Fraktion mehrfach mit 0,5 % Triton X-100-haltigem Puffer gewaschen. Ein Aliquot der so gereinigten *inclusion bodies* wurde mittels SDS-Page und Coomassie-Färbung auf seine Reinheit hin untersucht (Abb.3.1C). Die Abbildung 3.1C zeigt neben der GST-14.7K-Proteinbande bei 42 kDa in geringem Maße weitere Proteinbanden, welche entweder degradiertes GST-14.7K oder Verunreinigungen darstellen. Für die Immunisierung des Kaninchens wurden aber keine weiteren Reinigungsschritte durchgeführt.

Für die rekombinante Herstellung des His-14.7K zur späteren Aufreinigung des Antikörpers wurde 14.7K in den prokaryotischen Expressionsvektor pQE-30 kloniert (5.2.3), so dass 14.7K mit einem N-terminalen His-Tag versehen wurde. Die Proteinproduktion wurde in Bakterien vom Stamm *E. coli* M15[pREP4] (2.3.3) durchgeführt.

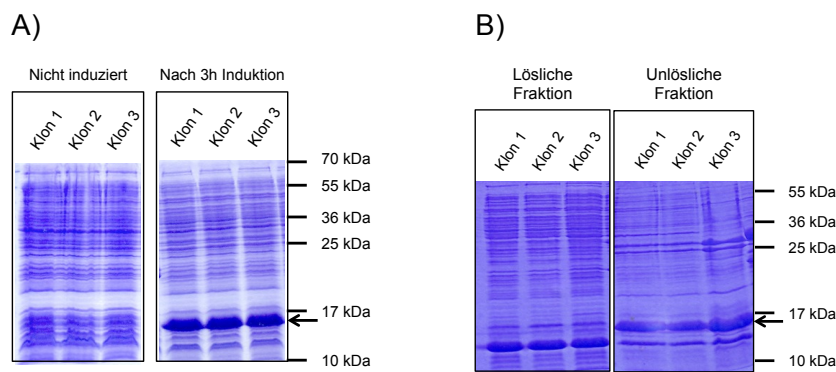


Abb. 3.2 Expression von His-14.7K in *E.coli* M15[pREP4]

A) Bakterien vom Stamm *E.coli* M15[pREP4] wurden mit pQE-30-14.7K transformiert und die Expression von His-14.7K wt mit IPTG in drei Klonen für 3 h induziert. Entnommene Aliquots vor und nach Induktion wurden mittels SDS-PAGE/Coomassie-Färbung analysiert.

B) Die Expressionskulturen wurden durch Inkubation mit Lysozym und Ultraschallbehandlung lysiert und durch Zentrifugation in lösliche und unlösliche Fraktion getrennt. Aliquots der jeweiligen Fraktion wurden mittels SDS-PAGE/Coomassie-Färbung analysiert.

Die His-14.7K-Bande ist durch einen Pfeil gekennzeichnet

Drei Klone wurden auf die Induzierbarkeit der Proteinexpression hin getestet. Wie der Abbildung 3.2A entnommen werden kann, wird His-14.7K in allen drei getesteten Klonen 3 h nach Induktion durch IPTG in etwa gleichen Mengen produziert.

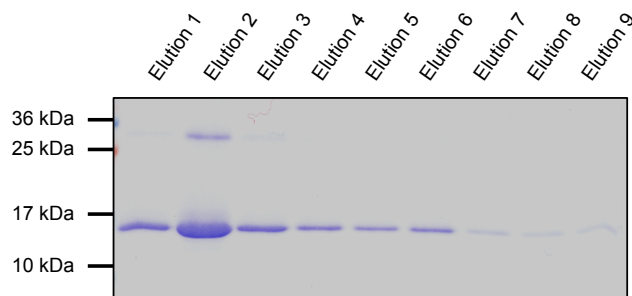
Wie für GST-14.7K wurde auch für His-14.7K die Löslichkeit bestimmt. Die Analyse der löslichen und unlöslichen Fraktionen der jeweiligen Expressionskulturen mit SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung zeigt, dass sich auch His-14.7K hauptsächlich in der unlöslichen Fraktion befindet (Abbildung 3.2B).

Die Aufreinigung des His-14.7K aus der unlöslichen Fraktion der Expressionskultur von Klon 3 erfolgte unter denaturierenden Bedingungen nach Anleitung des Protino Ni-IDA-2000 Systems (siehe 2.3.3). Dazu wurde das Pellet der unlöslichen Fraktion mit einem 8 M Harnstoff-haltigen Puffer solubilisiert und auf eine Ni-IDA (*iminodiacetic acid*) Säule geladen. His-markierte Proteine binden an immobilisierten Ni^{2+} -Ionen und können so affinitätschromatographisch isoliert werden. Die Elution erfolgte mit einem Imidazol-haltigen Elutionspuffer, wobei 9 Elutionsfraktionen gesammelt wurden. Diese wurden mit SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

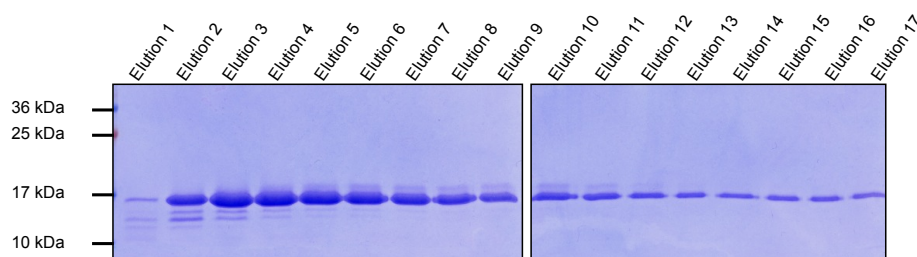
Die Abbildung 3.3A zeigt, dass in der Elutionsfraktion 2 die größte Menge His-14.7K eluierte. Allerdings taucht in dieser Fraktion eine Verunreinigung zwischen 25 und 35 kDa auf. Um diese vom gewünschten His-14.7K zu trennen, wurden die in Elutionsfraktion 2 enthaltenen Proteine mit Hilfe einer *Prep Cell* nach ihrer Größe entsprechende weiter aufgetrennt (siehe 2.3.4). Die Auftrennung durch SDS-PAGE und Färbung mittels Coomassie der einzelnen Elutionsfraktionen des *Prep Cell*-Laufs zeigte, dass die unerwünschte Proteinbande erfolgreich entfernt werden konnte (Abbildung 3.3.B). Die Reinheit der Elutionsfraktionen 13-15 wurde schließlich im Silbergel überprüft. Die Analyse durch eine Silberfärbung des Polyacrylamidgels ist um das 10- bis 100-fache sensitiver als die durch eine Coomassie-Färbung und kann bereits Proteinmengen zwischen

0,5 und 2 ng sichtbar machen. Abbildung 3.3 C zeigt nur noch einen geringen Grad an Proteinverunreinigung.

A)



B)



C)

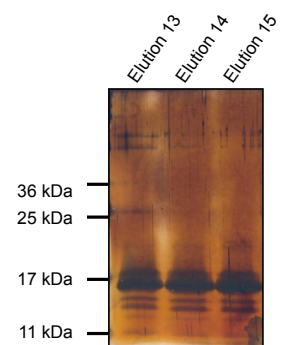


Abb. 3.3 Reinigung des rekombinanten His-14.7K

A) Die unlösliche Fraktion der Expressionskultur wurde mit 8 M Harnstoff-haltigem Puffer solubilisiert und auf eine Ni^{2+} -IDA-Säule zur affinitätschromatographischen Bindung von 14.7K geladen. Die Elution des Proteins erfolgte durch einen 250 mM Imidazol-haltigen Elutionspuffer, wobei 9 Fraktionen a 500 μl aufgefangen wurden. Pro Spur wurde 1 % der Elutionsfraktion geladen und mittels SDS-PAGE/Coomassie-Färbung analysiert. Die Elutionsfraktion 2 zeigt oberhalb der His-14.7K Bande eine Verunreinigung zwischen 25 und 35 kDa.

B) Die Elutionsfraktion 2 der Ni^{2+} -IDA Aufreinigung wurde auf eine *Prep Cell* geladen und elektrophoretisch aufgetrennt, um die Verunreinigung zu entfernen. Es wurden 17 Elutionsfraktionen gesammelt und durch SDS-PAGE/Coomassie-Färbung auf Gehalt und Reinheit hin untersucht.

C) Die Elutionsfraktionen 13-15 aus der elektrophoretischen Auftrennung durch die *Prep Cell* wurden durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Silberfärbung auf ihre Reinheit hin analysiert.

Die Elutionen 13-15 wurden vereinigt, gegen PBS dialysiert und der Firma immunoglobine GmbH zur Aufreinigung des Antikörpers zur Verfügung gestellt.

Der fertig aufgereinigte polyklonale Antikörper wird in der vorliegenden Arbeit als „anti-14.7K“ benannt.

3.1.2 Nachweis von 14.7K durch den Antikörper anti-14.7K in Western Blot, Immunpräzipitation und Immunfluoreszenz

Um die Spezifität und Verwendbarkeit des polyklonalen Antikörpers anti-14.7K zu bestimmen, wurde er in Western Blot, Immunpräzipitation und Immunfluoreszenz getestet. So konnte überprüft werden, ob der Antikörper sowohl natives als auch denaturiertes 14.7K-Protein erkennt.

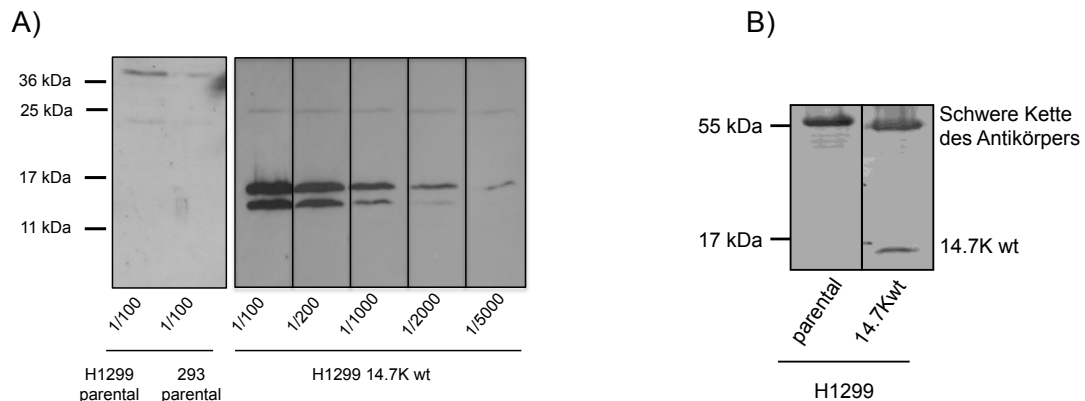


Abb. 3.4 Analyse des Antikörpers anti-14.7K in Western Blot und Immunpräzipitation

A) Je 50 µg Zelllysate aus parental H1299-, 293- und H1299/14.7K wt-Zellen wurden mit SDS-PAGE/Western Blot aufgetrennt und mit den angegebenen Verdünnungen des anti-14.7K-Antikörpers inkubiert.

B) SDS-PAGE/Western Blot-Analyse der Immunpräzipitation aus parental H1299- und H1299/14.7K wt-Zellen. Für die Immunpräzipitation wurde 1 µg anti-14.7K eingesetzt.

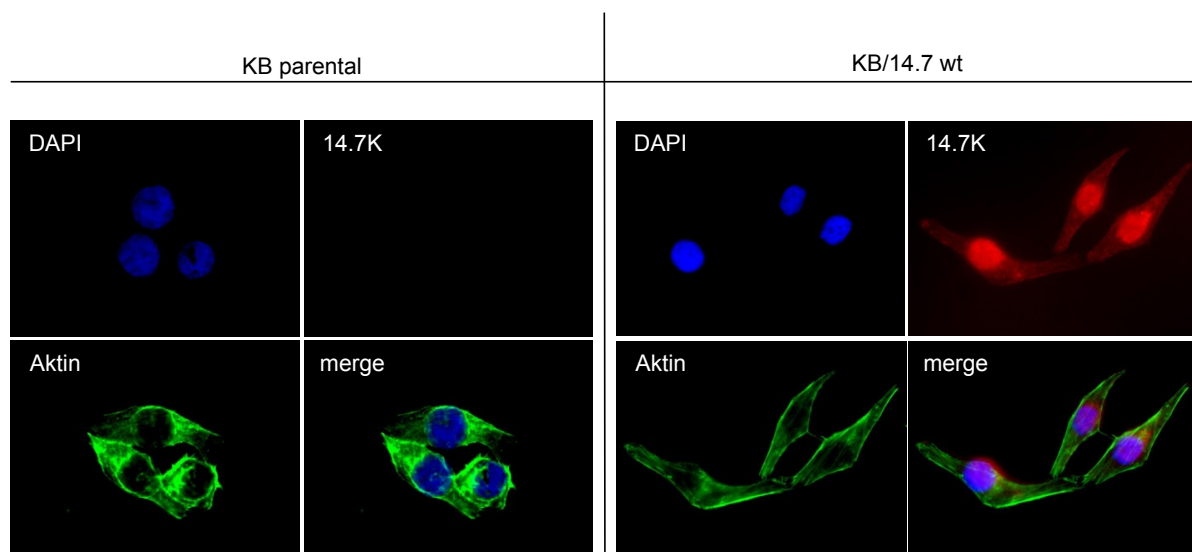
Wie in der Abbildung 3.4A dargestellt, wurden im Western Blot verschiedene Konzentrationen des Antikörpers getestet. Als Probe wurde Lysat von H1299/14.7K wt-Zellen verwendet und je 50 µg Protein pro Spur aufgetragen. Diese Zellen wurden durch retroviralen Gentransfer so verändert, dass sie 14.7K stabil exprimieren (siehe 3.3.1). Als Negativkontrolle diente Lysat von parental H1299- und HEK293-Zellen. Die Detektion von 14.7K wt durch den Antikörper ist bis zu der Verdünnung 1/200 sehr gut, lässt aber ab einer Verdünnung von 1/1000 deutlich nach. Für alle weiteren Western Blot -Analysen wurde deshalb eine Verdünnung von 1/500 gewählt.

Wie Abbildung 3.4 erkennen lässt, werden für 14.7K zwei Banden detektiert. Eine Kreuzreaktion mit zellulären Proteinen kann aber ausgeschlossen werden, da keine der Banden im Lysat parental H1299-Zellen erkannt wird. Es handelt sich also bei den beiden Banden um Isoformen des 14.7K-Proteins, die höchstwahrscheinlich auf posttranslationale Modifikationen (z.B. Phosphorylierungen) zurückzuführen sind. In einer Publikation von Ranheim wurden sogar bis zu drei Banden angegeben (Ranheim et al. 1993).

Neben der Anwendbarkeit des Antikörpers im Western Blot, eignet sich der 14.7K-spezifische Antikörper auch für die Immunpräzipitation (siehe Abb. 3.4B). Als Proben wurden hier ebenfalls Lysate der Zellen H1299/14.7K wt bzw. der parental Linie eingesetzt. Wie aus der Abbildung erkennbar, konnte nur in der Probe der H1299/14.7K wt-Zellen das adenovirale Protein

nachgewiesen werden, was für die Spezifität des Antikörpers spricht und zudem beweist, dass auch das native Protein erkannt wird.

Die Funktionalität des Antikörpers anti-14.7K in der Immunfluoreszenz geht aus Abbildung 3.5 hervor. Dazu wurden parentale KB- und KB/14.7K wt-Zellen (siehe dazu 3.3.1) mit anti-14.7K in einer Verdünnung von 1/100 in BSA inkubiert. Als Zweitantikörper wurde anti-*rabbit* Alexa-546 gewählt (rot). Um die subzelluläre Lokalisation besser beurteilen zu können, wurde außerdem Aktin mit Phalloidin-FITC (grün) und die Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt. Die Fluoreszenzaufnahme der anti-14.7K-Färbung der Zellen zeigte ein deutliches Signal in den KB/14.7K wt-Zellen, wohingegen parentale Zellen kein Signal zeigten. 14.7K ist überwiegend diffus im Zellkern und in geringen Mengen auch diffus im Cytoplasma verteilt.



3.5 Nachweis von 14.7K in KB/14.7K wt-Zellen

Parentale KB- und KB/14.7K wt-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und mit Paraformaldehyd fixiert. Nach Permeabilisierung durch 0,1 % Triton X-100 wurden die Zellen mit DAPI, Phalloidin-FITC und anti-14.7K inkubiert. Der Zweitantikörper zum Nachweis von 14.7K war Alexa 546 gekoppelt. Die Überlagerung der Einzelfärbungen sind unter „merge“ zu sehen. Die Aufnahmen wurden mit 63-facher Vergrößerung gemacht.

Der Antikörper anti-14.7K ist nach oben gezeigten Ergebnissen für den Nachweis von 14.7K im Western Blot, für die Immunpräzipitation und die Immunfluoreszenz geeignet.

3.2 Analyse der Interaktion von 14.7K-Mutanten mit Optineurin

Optineurin wurde als einer von vier 14.7K-Interaktionspartnern in einem *yeast two-hybrid screen* identifiziert (Li, Kang, et al. 1998). Unter diesen Interaktionspartnern war Optineurin der wahrscheinlichste Kandidat zur Vermittlung des anti-apoptotischen Effekts von 14.7K, da es TNF-induziert an den TNFR1-Komplex rekrutiert wird und über diverse Interaktionspartner in vesikuläre Transportprozesse und die Aktivierung des Transkriptionsfaktor NF κ B eingebunden ist (Sahlender et al. 2005, Zhu et al. 2007, Park et al. 2010, Nagabhusana et al. 2010). Außerdem zeigten Li et al., dass durch die Überexpression von Optineurin der 14.7K-vermittelte Schutz vor TNF-induzierter Apoptose revertiert werden konnte (Li, Kang, et al. 1998). Durch Untersuchungen verschiedener Mutanten von Optineurin, konnte die Interaktionsstelle mit 14.7K auf den C-terminalen Bereich von Optineurin eingegrenzt werden.

Die Analyse der Proteininteraktion von 14.7K-Mutanten mit Optineurin wurde aus zwei Gründen durchgeführt: Zum einen sollte herausgefunden werden, ob die Interaktion im Zusammenhang mit dem anti-apoptotischen Effekt des adenoviralen Proteins steht. Dazu wurden Mutanten benötigt, welche sich in ihren Bindungseigenschaften mit Optineurin unterscheiden. Zum anderen sollte untersucht werden, ob bestimmte strukturelle Bereiche dieser Funktion zu Grunde liegen bzw. spezielle Proteindomänen ihr zugeordnet werden können. Die für die folgenden Versuche verwendeten Mutanten von 14.7K wurden im Zuge der Doktorarbeit von Alexander Lehn (2006) hergestellt. Durch eine systematische Mutagenese wurden nach dem initialen ATG sequentiell je 15 Basenpaare durch ein verkürztes FLAG-Tag (GACTACAAGGACGAA) ausgetauscht. So standen für die vorliegende Arbeit 25 Mutanten zur Verfügung, welche im folgenden Schema (3.6) illustriert sind.

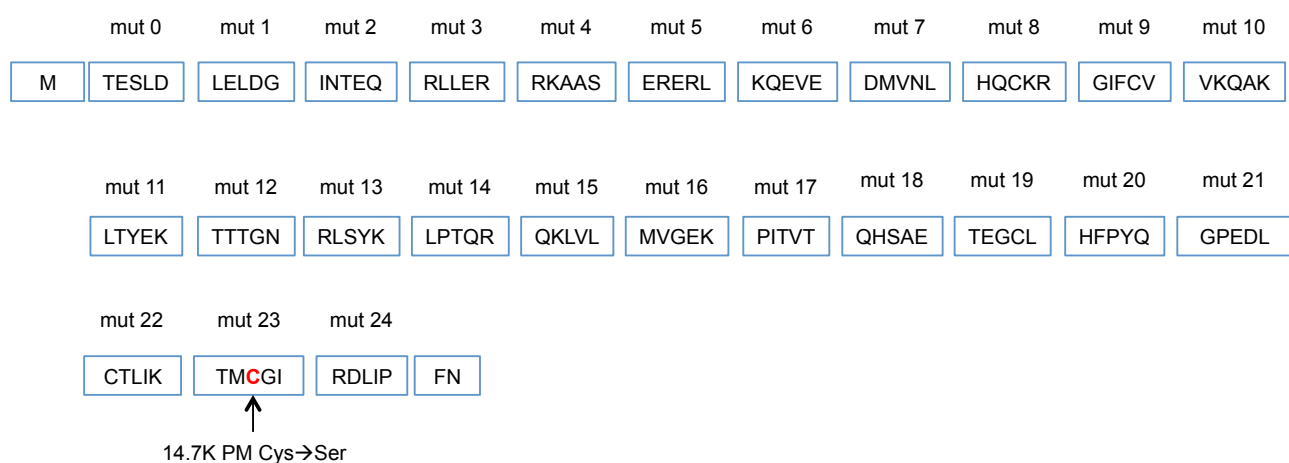


Abb. 3.6 Schema der 14.7K Mutanten

Die obere Reihe nennt die Bezeichnung der jeweiligen Mutanten. Die untere Reihe zeigt die Aminosäuresequenz von 14.7K, welche durch ein 5 Aminosäuren langes FLAG-Tag (DYKDE) ersetzt wurde.

Neben den oben beschriebenen Mutanten wurde außerdem eine funktionslose, also nicht-protective, Punktmutante (14.7K PM) als Negativkontrolle verwendet. Die Punktmutante, in welcher ein hochkonserviertes Cystein an Position 119 durch Serin ausgetauscht wurde, wurde erstmals 1993 von Ranheim (Ranheim et al. 1993) beschrieben und schützt Zellen nicht vor TNF-induzierter Apoptose.

Die 14.7K-Mutanten wurden in den Vektor pCMV-AD kloniert, welcher das jeweilige Insert mit einem amino-terminalen p65-Tag, der Aktivierungsdomäne des p65-Proteins, fusioniert.

Mittels Western Blot-Analyse konnte bestätigt werden, dass alle Mutanten als Fusionsprotein mit der Aktivator-Domäne in HEK293-Zellen exprimiert werden (Abb. 3.7)

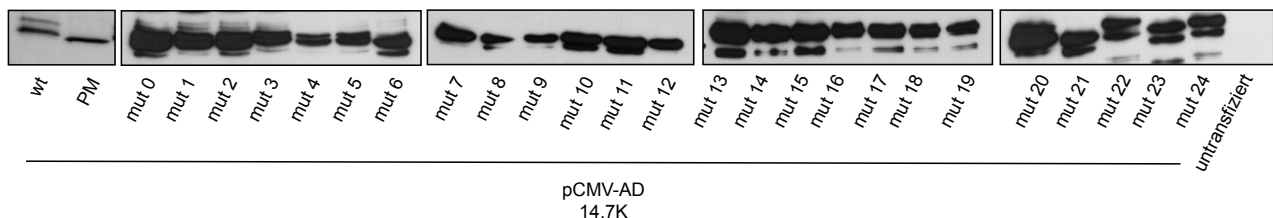


Abb. 3.7 Expression der 14.7K-Varianten im Vektor pCMV-AD in HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden mit 5 µg der genannten Konstrukte transfiziert und nach 48 h lysiert. Je 50 µg wurden pro Spur geladen und durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Die Detektion der Proteine erfolgte mit einem anti-p65 Antikörper, die Größe des Fusionsproduktes beträgt 35 kDa.

3.2.2 Mammalian Two-Hybrid Assay

Um die Interaktion der 14.7K-Mutanten mit der amino-terminalen Deletionsmutante von Optineurin (OPTNΔ 1-394) mit Hilfe des Mammalian Two-Hybrid Assay testen zu können, wurde diese in den Vektor pCMV-BD kloniert, welcher das Protein N-terminal mit der Bindedomäne des GAL4-Transkriptionsfaktor fusioniert. Die Interaktion der heterologen Fusionsanteile, p65-AD und GAL4-BD, ermöglicht die Bildung eines funktionellen Transkriptionsfaktors, welcher die Expression der Reporter-Luciferase (*Firefly*) induziert (2.2.9). Die Aktivität der Luciferase wurde in einem Luminometer gemessen. Zusätzlich konnte durch Co-Transfektion einer zweiten Luciferase (Renilla) die Transfektionseffizienz überprüft werden. So ergibt sich der für die relative Luciferaseaktivität berechnete Wert aus dem Verhältnis von Reporter-Luciferase *Firefly* zu Transfektionskontrolle-Luciferase Renilla.

Die Abbildung 3.8 zeigt die Ergebnisse der Interaktion der 14.7K-Mutanten mit OPTN Δ1-394. Die vorangestellte Positiv(pBD-p53/pAD-SV40T)- bzw. Negativ(pBD-p53/pAD-TRAF)-Kontrolle war Bestandteil des verwendeten Kits von Stratagene. Die funktionslose Punktmutante 14.7K PM zeigte erwartungsgemäß keine Interaktion, während 14.7K wt mit OPTN Δ1-394 interagierte.

Weiterhin ist aus der Abbildung ersichtlich, dass die 14.7K Mutanten sich in ihrem Bindeverhalten gegenüber OPTN Δ 1-394 unterscheiden. Neun Mutanten (mut 0, mut 1, mut 2, mut 3, mut 4, mut 5, mut 7, mut 17 und mut 20) zeigten eine Interaktion, die restlichen 15 Mutanten binden nicht an Optineurin. Dabei ist zu bemerken, dass Unterschiede in der relativen Luciferase-Aktivität zwischen den interagierenden Mutanten bestehen. Im Hinblick auf die Verteilung der Mutanten bezüglich der Interaktion, hat eine Sequenzveränderung in den ersten 35 Aminosäuren weniger Einfluss auf die Bindungseigenschaften von 14.7K als in den darauf folgenden Aminosäuren.

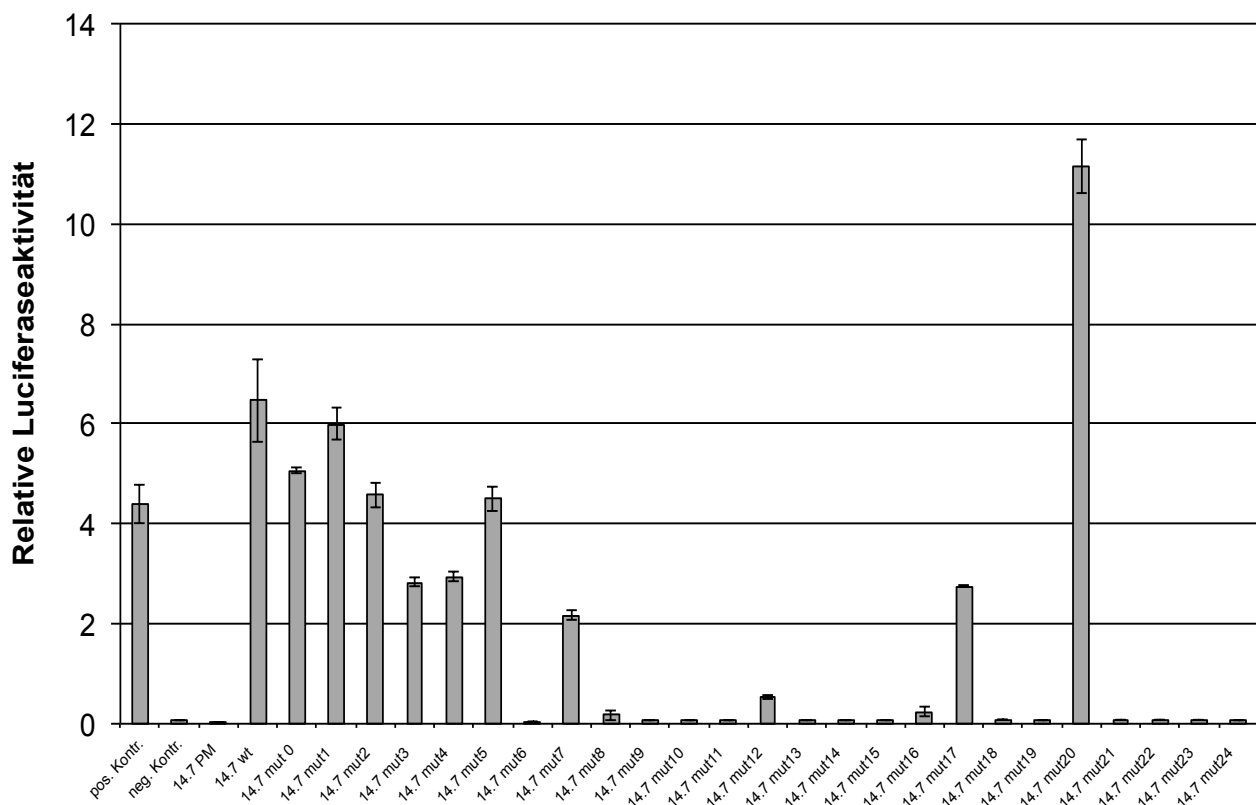


Abb. 3.8 Interaktion von Optineurin mit 14.7K im Mammalian Two-Hybrid Assay

HEK293-Zellen wurden mit den Expressionskonstrukten für 14.7K-Varianten (pCMV-AD), OPTN Δ 1-394 (pCMV-BD), pFR-Luc (Reporter-Luciferase *Firefly*) und pRL-TK (Transfektionskontrolle Renilla) transfiziert. Nach 48 h erfolgte die Lyse der Zellen und Quantifizierung der Luciferase-Aktivität. Angegeben ist die relative Luciferaseaktivität der Reporter-Luciferase *Firefly* bezogen auf die Transfektionskontrolle Renilla.

3.2.3 Co-Immunpräzipitation

Um die Ergebnisse aus dem Mammalian Two-Hybrid Assay mit einer zweiten Methode zu überprüfen, wurden die Bindungseigenschaften der 14.7K-Varianten auch in einer konventionellen Co-Immunpräzipitation getestet.

Dafür wurden die 14.7K-Varianten in den Expressionsvektor pQCXIP umkloniert. OPTN Δ 1-394 wurde in den Vektor pQCXIP-HA inseriert, wodurch das Protein mit einem amino-terminalen HA-Tag (YPYDVPDY) fusioniert wird. HEK293-Zellen wurden mit je 5 μ g der jeweiligen Konstrukte co-transfiziert und 48 h später lysiert. Das Lysat wurde mit anti-HA-Agarose inkubiert und das erhaltene Präzipitat durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mittels HA-Antikörper bzw. anti-14.7K-Antikörper.

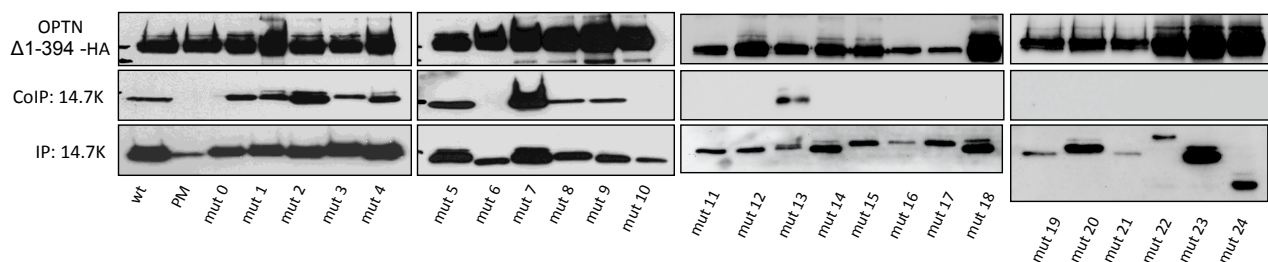


Abb. 3.9 Co-Immunpräzipitation von Optineurin und 14.7K

HEK293-Zellen wurden mit den angegebenen 14.7K-Varianten im Expressionsvektor pQCXIP und pQCXIP-HA-OPTN Δ 1-394 co-transfiziert und nach 48 h lysiert. Das Lysat wurde mit HA-Agarose inkubiert und das Präzipitat durch SDS-PAGE/Western Blot analysiert.

Das Ergebnis des Mammalian Two-Hybrid Assay zur Proteininteraktion konnte in den meisten Fällen in der Co-Immunpräzipitation verifiziert werden. Ausnahmen bildeten hierbei jedoch die Mutanten 8, 9, 13, 17 und 20, die im Mammalian Two-Hybrid Assay als Optineurin-Binder auftraten (Abb. 3.8), in der Co-Immunpräzipitation jedoch nicht mit Optineurin präzipitiert werden konnten (Abb. 3.9). Auffällig ist die starke Abweichung vom vorhergesagten Molekulargewicht bei den Mutanten mut 22 und mut 24. Zudem erscheinen einige der 14.7K-Varianten als Doppelbande, was auch schon in Abbildung 3.7 bemerkt wurde.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch beide Assays zur Interaktion von OPTN Δ 1-394 und 14.7K-Varianten sowohl Binder als auch Nicht-Binder identifiziert werden konnten.

Möglicherweise ist die Interaktion von Optineurin mit 14.7K für dessen anti-apoptotischen Effekt notwendig. Um diese Hypothese zu prüfen, sollten 14.7K-Mutanten mit unterschiedlichem Bindungsverhalten auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, Zellen vor TNF-induzierter Apoptose zu schützen. Dazu wurden insgesamt acht 14.7K-Mutanten ausgewählt: vier Binder mit N-terminaler Mutation (mut 0, 2, 3, und 5), sowie 3 Nicht-Binder mit C-terminaler Mutation (mut 18, 19 und 21). Zusätzlich sollte die Mutante mut 20 funktionell charakterisiert werden, weil sie das stärkste Interaktionssignal im Mammalian Two-hybrid-Assay aufwies, jedoch in der Co-Immunpräzipitation keine Interaktion zeigte.

3.3 Analyse der anti-apoptotischen Funktion ausgewählter 14.7K-Mutanten

Um die Bedeutung der Interaktion für die Vermittlung des anti-apoptotischen Effekts zu beurteilen, wurden durch retrovirale Transduktion Zelllinien generiert, welche die 14.7K-Varianten stabil exprimieren. Die Transduktion wurde mit den Zelllinien H1299 (humane Lungenkarzinom-Zellen) und KB (humane Epithelzellen, HeLa-Derivat) durchgeführt.

Die Herstellung stabil exprimierender Zelllinien wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

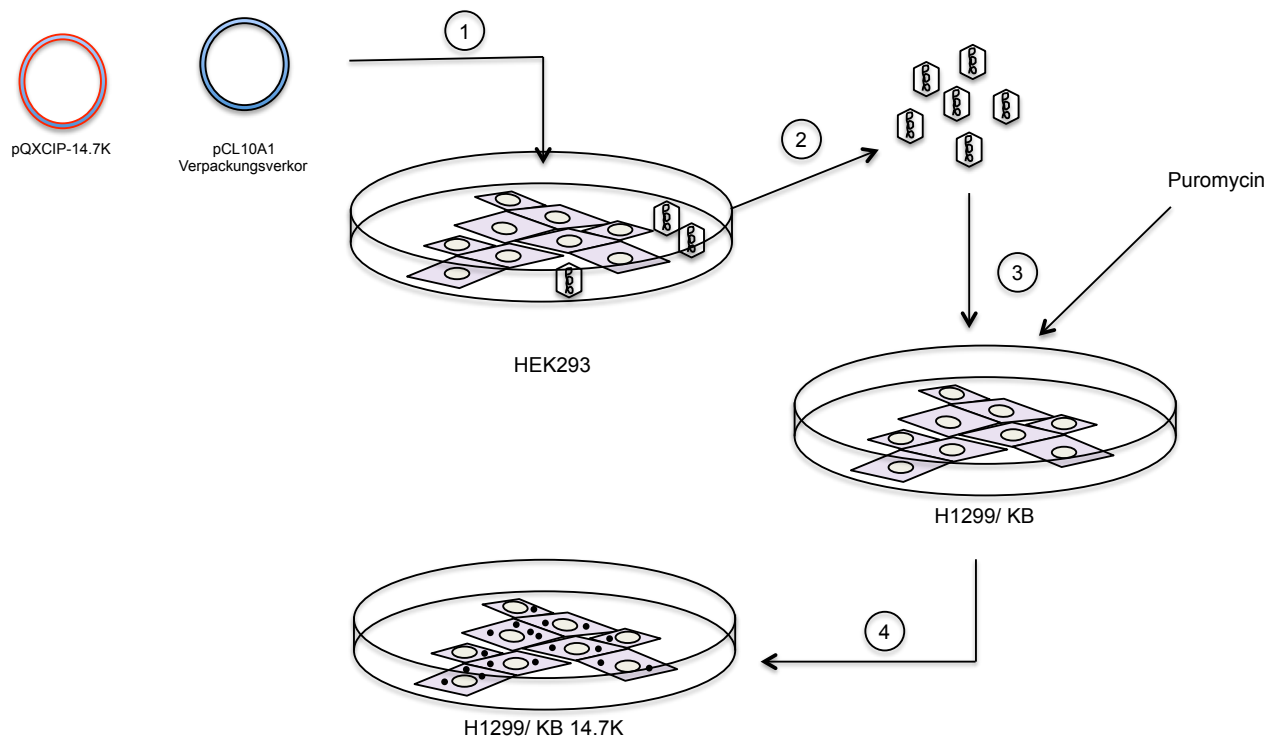


Abb. 3.10 Schematische Darstellung der Generierung stabiler Zelllinien

(1) HEK293-Zellen wurden mit dem Expressionsvektor pQCXIP-14.7K und dem Verpackungsvektor pCL10A1 co-transfiziert. 48 h nach Transfektion konnten rekombinante Retroviren aus dem Überstand der HEK293-Zellen gefiltert (2) und die Zielzelllinie damit infiziert werden (3). Nach Selektion der Zellen durch Puromycin wurde die stabile Zelllinie H1299/14.7K bzw. KB/14.7K erhalten (4). Siehe dazu auch 2.2.6.

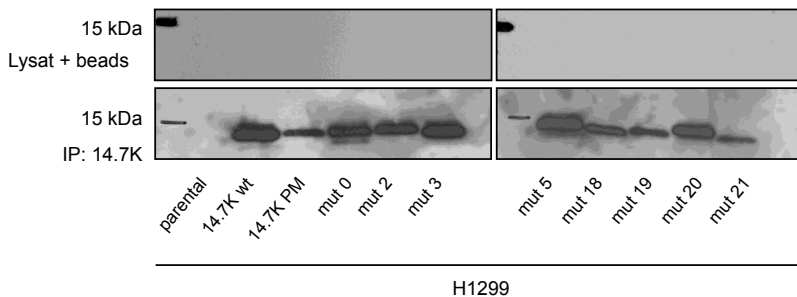
3.3.1 Stabile Expression der 14.7K-Varianten in H1299- und KB-Zellen

In H1299-Zellen wurden folgende 14.7K-Varianten stabil exprimiert: 14.7K wt, 14.7K PM sowie die 14.7K-Varianten mut 0, mut 2, mut 3, mut 5, mut 18, mut 19, mut 20, und mut 21. Zur Bestätigung der Ergebnisse in einer zweiten Zelllinie wurden 14.7K wt, 14.7K PM, sowie je ein Binder (mut 0) bzw. Nicht-Binder (mut 20) in KB-Zellen stabil exprimiert. Im Folgenden werden die verschiedenen 14.7K-Varianten exprimierenden Zelllinien kurz als „H1299/14.7K“ bzw. „KB/14.7K“ bezeichnet.

Zum Nachweis der stabilen Expression der 14.7K-Varianten wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt, da 14.7K PM aufgrund seiner Instabilität oder seines niedrigen Expressionsniveaus

sonst nicht nachgewiesen werden konnte. Die Abbildung 3.11 zeigt, dass in allen Zelllinien die entsprechende Variante von 14.7K exprimiert wurde. Parentale Zellen dienten als Negativkontrolle.

A



B)

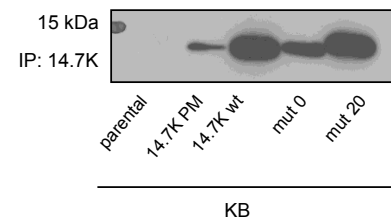


Abb. 3.11 Immunpräzipitation zum Nachweis der stabilen Expression der 14.7K-Varianten in H1299- und KB-Zellen

Lysate der genannten Zelllinien wurden mit 1 µg anti-14.7K-Antikörper und Protein G-Sepharose inkubiert. Die Analyse des Präzipitats erfolgte über SDS-PAGE und Western Blot. Als Kontrolle wurden parentale H1299- bzw. KB-Zellen verwendet. Die Detektion der Proteine im Western Blot erfolgte durch den anti-14.7K-Antikörper.

- A) Immunpräzipitation aus stabil exprimierenden H1299-Zellen
- B) Immunpräzipitation aus stabil exprimierenden KB-Zellen

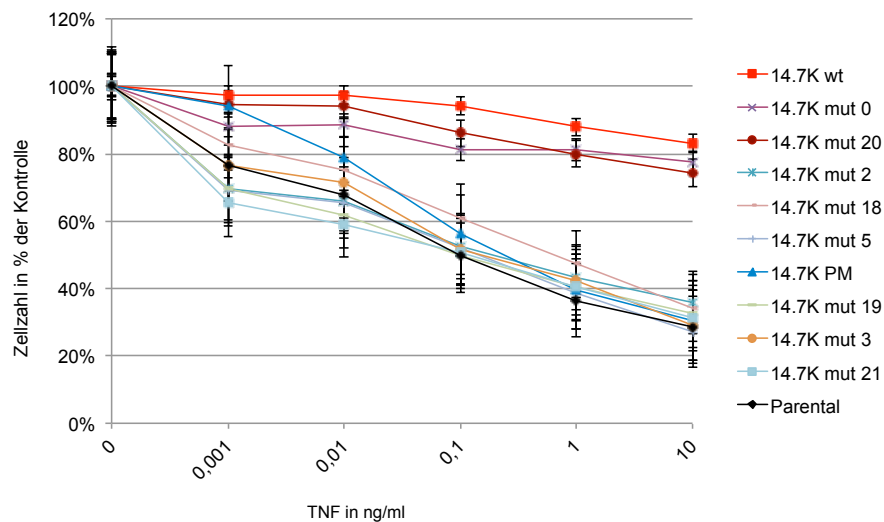
3.3.2 Zytotoxizitätsassay

In einem Zytotoxizitätsassay werden Zellen steigenden Konzentrationen von TNF ausgesetzt und der zytotoxische Effekt des Zytokins anhand der Menge überlebender Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen gemessen. Überlebende Zellen werden nach Inkubation durch Kristallviolett gefärbt. Die Intensität der Färbung wird im Photometer gemessen, wobei die Intensität der Färbung proportional zur Menge der gefärbten Zellen ist.

Die TNF-Resistenz von 14.7K wt, sowie die TNF-Sensitivität von 14.7K PM wurde von Ranheim bereits vergleichend dargestellt (Ranheim et al. 1993). In den folgenden Versuchen wurden Zelllinien mit diesen Varianten daher neben parentalen Zellen als Kontrollen verwendet. Da die Stimulation mit TNF gleichzeitig pro-apoptotische (Aktivierung der Caspase-8) und anti-apoptotische (Aktivierung von NFκB) Signalwege in Gang setzt, wurde die Neusynthese Apoptosehemmender Proteine durch die Zugabe des Translationsinhibitors Cycloheximid (CHX) unterdrückt. Sofern die Zellen also nicht durch die Expression einer protektiven 14.7K-Variante geschützt waren, gingen sie zugrunde. Die oben genannten 14.7K-Varianten wurden nun im Zytotoxizitätsassay hinsichtlich ihrer protektiven Eigenschaften gegenüber TNF-vermittelter Zytolyse getestet.

Die Zellen wurden dafür in Triplikaten in 96-Well-Platten gesät und mit Cycloheximid (CHX) und ansteigenden TNF-Konzentrationen behandelt. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz nur mit CHX behandelt.

A)



B)

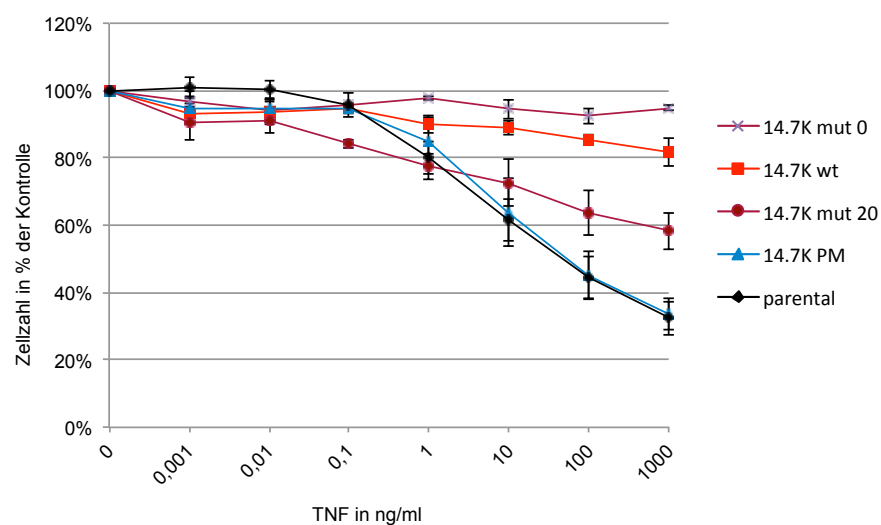


Abb. 3.12 Schutz durch 14.7K-Mutanten gegenüber TNF-medierter Apoptose

Oben genannte Zelllinien wurden in Triplikaten in 96-Well-Platten gesät, mit Cycloheximid behandelt und mit ansteigenden TNF-Konzentrationen inkubiert. Tote Zellen wurden durch Waschen mit PBS entfernt, TNF-resistente Zellen wurden mit Kristallviolett gefärbt. Die Intensität der Färbung wurde im Photometer gemessen und verhält sich proportional zur Zellzahl. Die gemessenen Werte wurden auf die nur mit CHX behandelten Zellen normalisiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten.

A) H1299-Zellen nach 16 h Inkubation mit CHX und TNF

B) KB-Zellen nach 7 h Inkubation mit CHX und TNF

Die Abbildung 3.12A zeigt die TNF-Resistenz durch genannte 14.7K-Mutanten in H1299-Zellen. Nach 16 h Inkubation mit TNF/CHX lassen sich die Mutanten in eine protektive und eine nicht-protektive Gruppe teilen. Die Mutanten mut 0 und mut 20 gehören mit bis zu 20 % Zellverlust zu der TNF-resistenten Gruppe, während die übrigen getesteten Mutanten mit bis zu 70 % Zellverlust zur TNF-sensitiven Gruppe gehören. Mut 0 und mut 20 sind demnach ähnlich protektiv wie 14.7K wt. Dass durchaus Unterschiede in der protektiven Eigenschaft der 14.7K-Mutanten zwischen den Zelllinien H1299 und KB bestehen, wird durch die Abbildung 3.12B deutlich. Die Mutante mut 0 verhält sich in KB-Zellen ähnlich wie in H1299-Zellen, die Mutante mut 20 zeigt jedoch in KB-Zellen eine intermediäre TNF-Resistenz. Mit bis zu 40 % Zellverlust liegt die TNF-Resistenz durch mut 20 zwischen der von mut 0 (bis zu 20 % Zellverlust) und den Negativkontrollen 14.7K PM-exprimierenden und den parental Zellen (bis zu 70 % Zellverlust). Fasst man die Ergebnisse aus den Untersuchungen zum Interaktionsverhalten der 14.7K-Varianten mit den Ergebnissen zur TNF-Resistenz zusammen, so ist ersichtlich, dass es keine Korrelation zwischen der Interaktion von 14.7K mit Optineurin und der Vermittlung des anti-apoptotischen Effekts gibt. Einerseits wirken Optineurin-bindende 14.7K-Mutanten (mut 2, mut 3, mut 5) nicht mehr anti-apoptotisch, während andererseits die nicht-interagierende 14.7K-Mutante mut 20 zumindest in H1299-Zellen ebenso protektiv wie 14.7K wt ist.

3.3.3 Fluorimetrische Analyse der Caspase-8-Aktivierung

Die Einleitung der TNF-induzierten Apoptose beginnt mit der autokatalytischen Spaltung der Pro-Caspase-8 in ihre aktive Form (Boldin et al. 1995), weshalb sie auch Initiator-Caspase genannt wird. Es ist bekannt, dass die Anwesenheit des adenoviralen 14.7K-Proteins in Zellen durch Hemmung der DISC-Rekrutierung an den aktivierten TNFR1 inhibierend auf die Aktivierung der Caspase-8 wirkt (Schneider-Brachert et al. 2006) (siehe 1.5). Um den anti-apoptotischen Effekt der TNF-resistenten 14.7K-Mutanten mut 0 und mut 20 biochemisch zu charakterisieren, wurde in den entsprechenden Zellen die Aktivität der Caspase-8 nach sechstündiger TNF-Stimulation (100 ng/ml) bestimmt. Um die Gegenregulation durch zelleigene Caspase-Inhibitoren zu verhindern, wurden die Zellen mit CHX vorinkubiert.

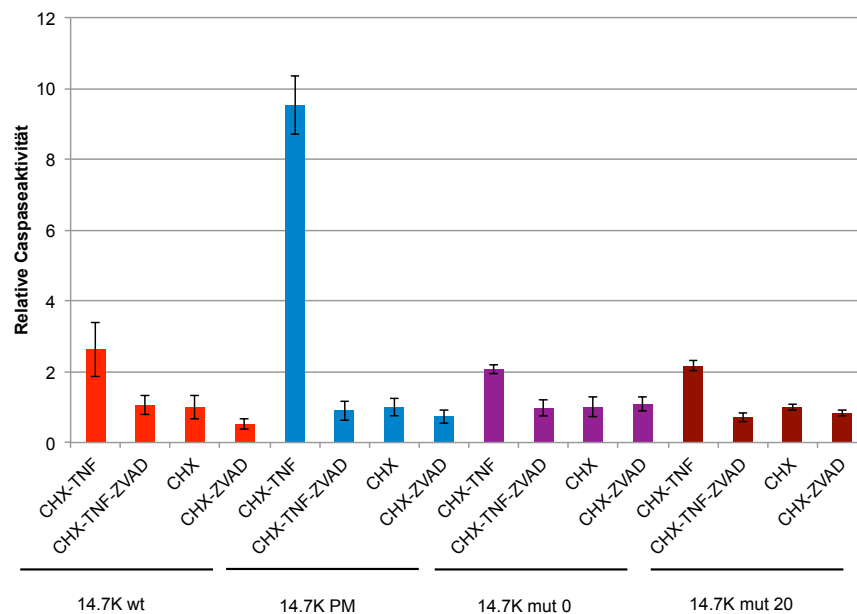
Nach der Stimulation wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der Caspase-8 durch Messung des Umsatzes des Caspase-8-spezifischen Substrats IETD-AMC bestimmt. Die Spezifität der Caspase-Messung wurde durch die Verwendung des Caspase-Hemmers zVAD sichergestellt, welcher irreversibel an das katalytisch aktive Zentrum der Protease bindet (2.2.11). Die dargestellte relative Caspase-Aktivität wurde wie folgt berechnet:

Die Abspaltung von AMC aus IETD-AMC führt zu einem anregbaren Fluorophor (360 nm), dessen Emission bei 440 nm detektiert werden kann. Für die Bestimmung der Caspase-8-Aktivität wurde über einen Zeitraum von 145 Min. alle 5 Min. die Emission gemessen und als Kurve in

Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Die Steigung der Kurve gibt die relative Menge des entstandenen Lichts (*relative Light Unit*, RLU) pro Minute (RLU/min) an. Anhand der Steigung einer Eichgeraden wurde ermittelt, wieviel pmol AMC welcher relativen Lichtmenge entspricht. Somit konnte durch das Verhältnis aus der Steigung der Messgeraden (RLU/min) zu der Steigung der Eichgeraden (RLU/pmol AMC) der Umsatz von AMC in pmol/min berechnet werden. Der Umsatz pmol AMC/min der einzelnen Proben wurde anschließend auf den Wert für die unstimulierte, nur mit CHX-behandelte Probe normalisiert. Der Test zur Bestimmung der Caspase-8-Aktivität wurde sowohl für die protektiven Varianten der H1299/14.7K- wie auch für KB/14.7K-Zellen durchgeführt (Abb. 3.13).

Insgesamt lässt sich feststellen, dass sich die Situation der TNF-Resistenz bzw. TNF-Sensitivität aus den Zytotoxizitätsassays (Abb. 3.12) in der gemessenen Caspase-8-Aktivität widerspiegelt. Während sich in H1299/14.7K PM- und KB/14.7K PM-Zellen diese um das 9- bzw. 6,5-fache im Vergleich zur unstimulierten CHX-Kontrolle erhöhte, war die Erhöhung bei 14.7K wt exprimierenden Zellen nur etwa doppelt so hoch. H1299/mut 0 und H1299/mut 20 zeigten eine ähnliche Hemmung der Caspase-8-Aktivierung wie H1299/14.7K wt (Abb. 3.13A). Die Zelllinien KB/14.7K mut 0 und KB/mut 20 zeigten hingegen beide eine fast 4-fache Erhöhung der Caspase-Aktivität nach TNF-Stimulation. Unter Berücksichtigung der TNF-Resistenz dieser Zelllinien (Abb. 3.12B) war dies ein unerwartetes Ergebnis, da eine stärkere Caspase-8-Aktivierung nur für die intermediär protektive Mutante mut 20 zu erwarten gewesen wäre.

A)



B)

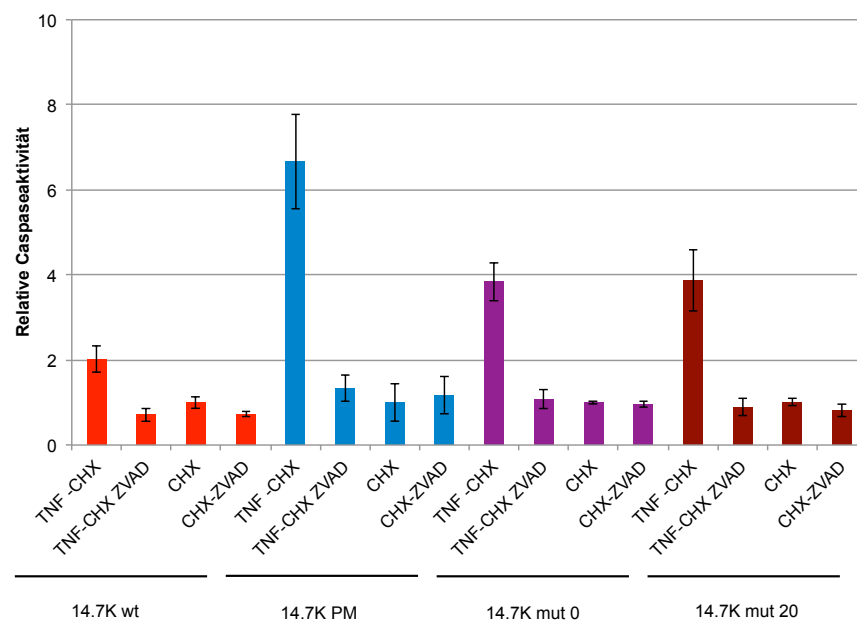


Abb. 3.13 Fluorimetrische Bestimmung der Caspase-8-Aktivität in H1299- und KB-Zellen

H1299- und KB-Zellen wurden mit CHX und TNF für 6 h inkubiert und anschließend lysiert. Die Aktivität der Caspase-8 wurde durch die Spaltung des Caspase-8-spezifischen Substrats IETD-AMC in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Mit Hilfe einer Eichgeraden wurde der Substratumsatz in pmol AMC/min umgerechnet und auf den Wert der unstimulierten, nicht mit TNF behandelten Zellen, normalisiert (entspricht hier dem nur mit CHX beschrifteten Wert). A) zeigt das Ergebnis der Bestimmung der Caspase-8-Aktivität in stabil exprimierenden H1299-Zellen, B) in KB-Zellen. 14.7K wt- und 14.7K PM-exprimierende Zellen dienen als Positiv- bzw. Negativkontrolle. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten.

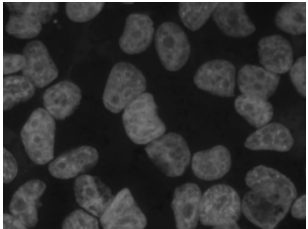
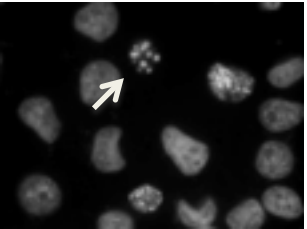
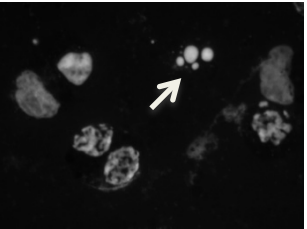
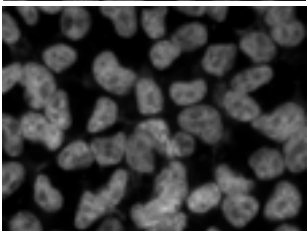
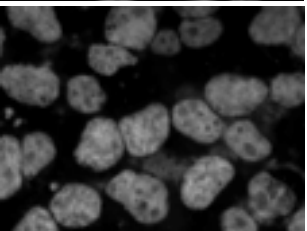
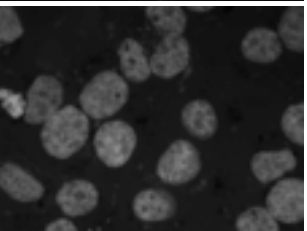
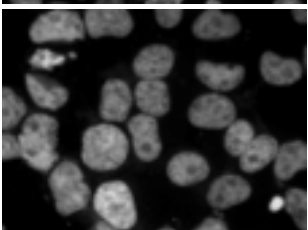
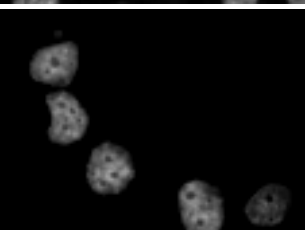

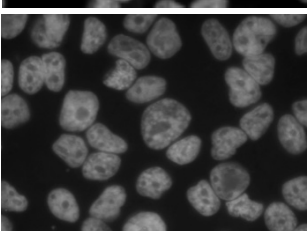
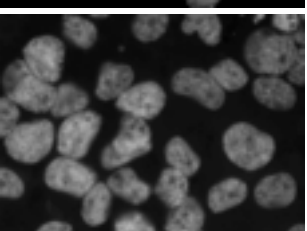
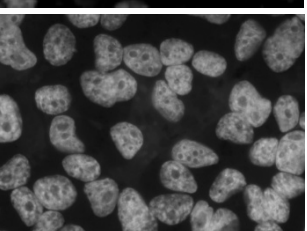
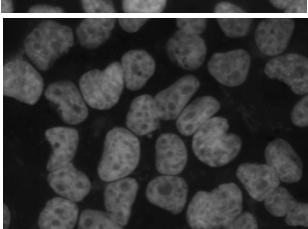
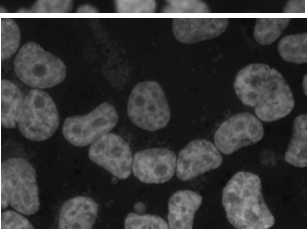
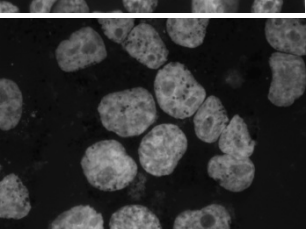
3.3.4 Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Zellkerne nach TNF-Stimulation

Ein typisches Anzeichen der Apoptose ist die Kondensation und Fragmentation des Chromatins (Kerr et al. 1972). Zur Visualisierung dieses apoptotischen Effekts, wurden Zellen der verschiedenen Zelllinien auf Deckgläschen ausgesät und mit CHX und TNF für 16 (H1299) bzw. 7 Stunden (KB) inkubiert. Dabei wurden zwei verschiedene TNF-Konzentrationen gewählt, um den dosisabhängigen toxischen Effekt von TNF zu verdeutlichen. Die Zellen wurden mit Paraformaldehyd fixiert und für die Mikroskopie präpariert. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit dem Kern-Farbstoff DAPI. Die Abbildungen der Zellkerne wurden im Fluoreszenzmikroskop bei 63-facher Vergrößerung aufgenommen. Sowohl bei parentalen Zellen als auch bei 14.7K PM-exprimierenden Zellen (3.14A H1299, 3.14B KB) war schon bei 1 ng/ml TNF die Kondensation des Chromatins zu beobachten (durch Pfeile gekennzeichnet), wobei sich dieser Effekt bei der zehnfachen TNF-Konzentration noch verstärkte. 14.7K wt und ebenso die TNF-resistenten Mutanten mut 0 und mut 20 zeigen durchweg intakte Zellkerne. Tote Zellen können nicht dargestellt werden, da sie sich bereits vor der Färbung vom Deckgläschen ablösten.

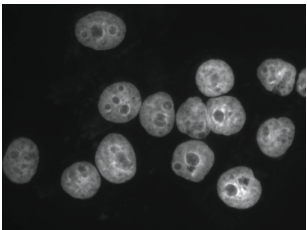
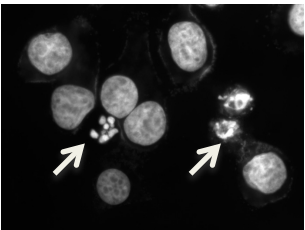
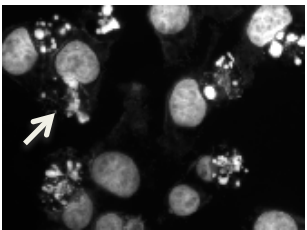
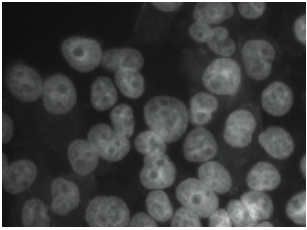
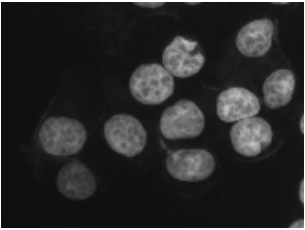
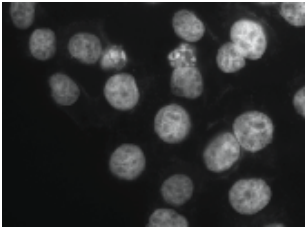
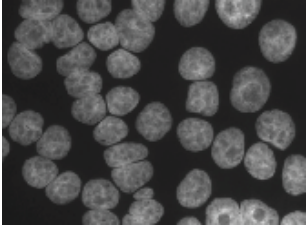
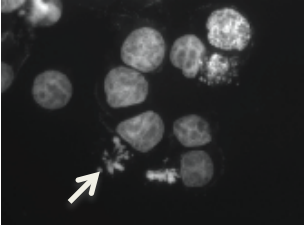
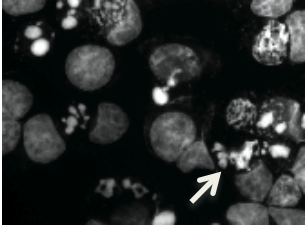
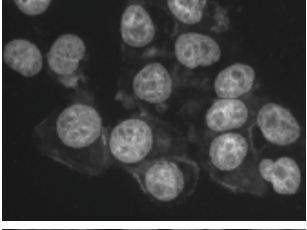
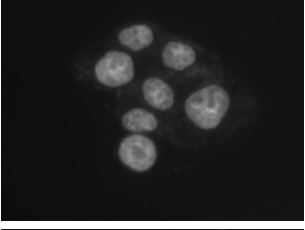
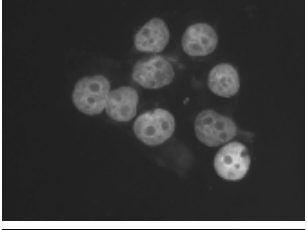
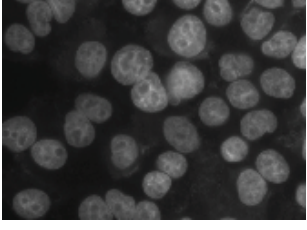
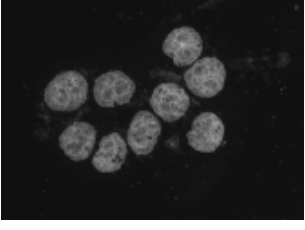
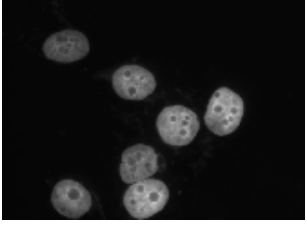
Abb. 3.14 Mikroskopische Analyse der Zellkerne nach TNF-Stimulation

Die Zellen der aufgeführten Zelllinien H1299 (A) und KB (B) wurden mit CHX behandelt und mit den angegebenen TNF-Konzentrationen für 16 h bzw. 7 h auf Coverslips inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit DAPI-haltigem Medium eingebettet. Die Aufnahme der Zellkerne erfolgte bei 63-facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop. Kondensierte Chromatinstrukturen sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. (Abbildung auf den folgenden Seiten)

A)

H1299	12,5 µg/ml CHX	12,5 µg/ml CHX 1 ng/ml TNF	12,5 µg/ml CHX 10 ng/ml TNF
parental			
14.7K wt			
14.7K PM			
14.7K mut 0			
14.7K mut 20			

B)

KB	12,5 µg/ml CHX	12,5 µg/ml CHX 1 ng/ml TNF	12,5 µg/ml CHX 10 ng/ml TNF
parental			
14.7 wt			
14.7 PM			
14.7 mut 0			
14.7 mut 20			

3.4 Suppression der endogenen Optineurin-Expression durch siRNA

In den vorangegangenen Abschnitten konnte dargelegt werden, dass die Interaktion mit Optineurin nicht mit dem anti-apoptotischen Effekt von 14.7K korreliert. Es gab sowohl 14.7K-Mutanten, die trotz Interaktion mit Optineurin Zellen nicht mehr vor TNF-induzierter Apoptose schützten, sowie eine protektive Mutante, die aber die Fähigkeit zur Interaktion mit Optineurin verloren hatte. Im Rahmen dieser Untersuchungen war aber stets zelluläres Optineurin in den Zellen vorhanden, so dass eine Beteiligung des Proteins an den von 14.7K beeinflussten Prozessen trotz Interaktionsverlust nicht völlig ausgeschlossen werden konnte. Deshalb sollte durch die Unterdrückung der endogenen Optineurin-Expression als nächstes getestet werden, ob die protektiven Eigenschaften von 14.7K wt, mut 0 und mut 20 auch in Abwesenheit des Interaktionspartners aufrechterhalten werden können. Dazu wurden die Zellen mit siRNA (*small interfering RNA*) transfiziert, um die Optineurin-Expression auf RNA-Level sequenzspezifisch zu inhibieren.

3.4.1 Kontrolle der Wirkungsdauer von Optineurin-siRNA in parental H1299-Zellen

Die siRNA besteht aus kurzen, doppelsträngigen RNA-Molekülen mit einer Länge von 19-21 Nukleotiden mit symmetrischen 2-3 Nukleotiden langen 3' Überhängen und 5' Phosphatgruppen (Bernstein et al. 2001; Zamore et al. 2000). Der *antisense*-Strang der RNA-Duplex dient als Matrize für den sequenzspezifischen Abbau der Ziel-RNA durch die RNAi-Maschinerie (Rana 2007). Nach Beladung des *RNA-induced silencing complex* (RISC) mit dem antisense-Strang kann die komplementäre Sequenz der Ziel-mRNA gebunden und gespalten werden. Durch Nukleasen werden die Spaltprodukte abgebaut und das Zielprotein kann nicht mehr synthetisiert werden. Durch Transfektion können chemisch hergestellte siRNA-Moleküle in die Zelle eingebracht werden, wobei, wie in der vorliegenden Arbeit angewendet, ein sog. siRNA-*Pool* verwendet werden kann. Dieser *Pool* besteht aus vier verschiedenen RNA-Sequenzen, wobei jede siRNA zu einem anderen Abschnitt der Zielsequenz komplementär ist. Die Effizienz der Suppression wird damit gesteigert. Die Wirkungsdauer der siRNA bedingten Suppression ist begrenzt, da aufgrund von Zellteilungen und RNA-Abbau die Menge zur Verfügung stehender siRNA stetig abnimmt.

Daher wurde zunächst die Dauer der Suppression in H1299-Zellen bestimmt. Da keiner der an die siRNA-Transfektion anschließenden Versuche länger als vier Tage dauerte, wurde die Expression von Optineurin nach einmaliger siRNA-Transfektion über einen Zeitraum von sechs Tagen überprüft.

Die Zellen wurden dafür in eine 6-Well-Platte gesät und mit Optineurin-spezifischer siRNA transfiziert. An sechs darauffolgenden Tagen wurden die Zellen jeweils eines Wells mit einer Trypsin-Lösung abgelöst und lysiert. Die erhaltenen sechs Lysate wurden dann im Western Blot auf die Expression von Optineurin hin analysiert. Zur Kontrolle wurden parallel Zellen mit

sogenannter „siRNA-scramble“, also unspezifischer siRNA ohne Zielsequenz, transfiziert, um zum einen die Spezifität der Ziel-Sequenz siRNA (siRNA-Optineurin) zu überprüfen und um andererseits sicherzustellen, dass nicht allein die Transfektion einer beliebigen siRNA die Expression von Optineurin beeinflusst. Weiterhin wurde durch optische Auswertung beobachtet, ob der Vorgang der siRNA-Transfektion sich negativ auf die Vitalität der Zellen auswirkte.

Die Abbildung 3.15 zeigt, dass die Optineurin-Expression durch die sehr effiziente Wirkung der siRNA bis zu 6 Tage bis unter die Nachweisgrenze supprimiert werden konnte.

Im Falle der Zelllinie H1299 muss jedoch erwähnt werden, dass die Zellen nach Behandlung mit siRNA-Optineurin deutlich granulärer waren als siRNA-scramble behandelte Zellen und der Verlust von zellulärem Optineurin für diese Zellen einen Vitalitätsverlust darstellt. KB-Zellen waren von der Unterdrückung der Optineurin-Expression kaum beeinträchtigt.

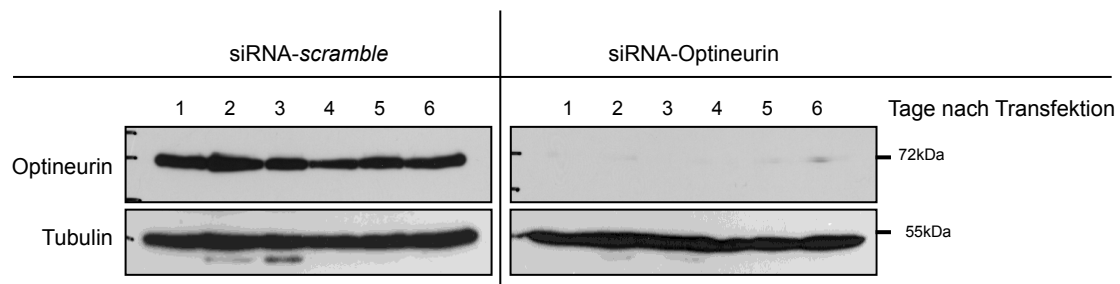


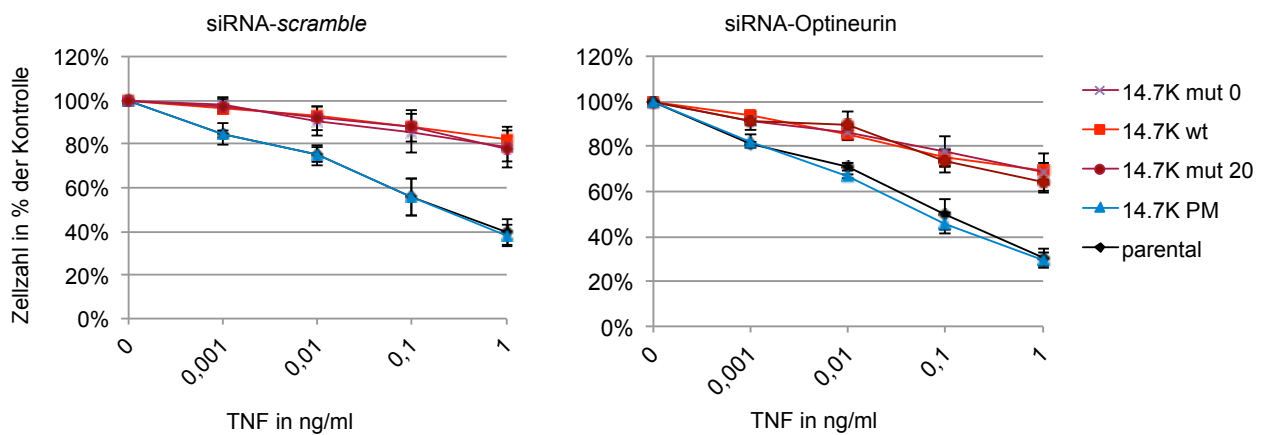
Abb. 3.15 Dauer und Effizienz der Suppression des endogenen Optineurin nach siRNA-Transfektion

Parentale H1299-Zellen wurden in einer 6-Well-Platte mit siRNA-Optineurin und siRNA-scramble transfiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten (Tagen nach Transfektion) lysiert. Im Western Blot wurden die Lysate auf die Anwesenheit von endogenem Optineurin hin analysiert (Detektion durch anti-Optineurin-Antikörper). Als Ladekontrolle wurde im selben Blot Tubulin detektiert.

3.4.2 Analyse der anti-apoptotischen Funktion der protektiven 14.7K-Varianten nach Optineurin-Suppression

Auch wenn es aufgrund der Ergebnisse aus den vorhergegangenen Zytotoxizitätsassays (3.3.2) sehr wahrscheinlich ist, dass es keinen Zusammenhang zwischen der Optineurin-Interaktion und der 14.7K-vermittelten TNF-Resistenz gibt, sollte getestet werden, ob der protektive Effekt auch in Abwesenheit von endogenem Optineurin aufrecht erhalten werden kann. Dazu wurden Zellen der oben genannten Zelllinien mit siRNA-Optineurin transfiziert und 48 h später ein Zytotoxizitätsassay durchgeführt. Nach dem Trypsinieren und vor dem Aussäen der Zellen für den Zytotoxizitätsassay wurden Aliquots der Zellen entnommen und für die Analyse der Optineurin-Expression im Western Blot lysiert. Als Kontrollen dienten parentale und 14.7K PM-exprimierende Zellen.

A)



B)

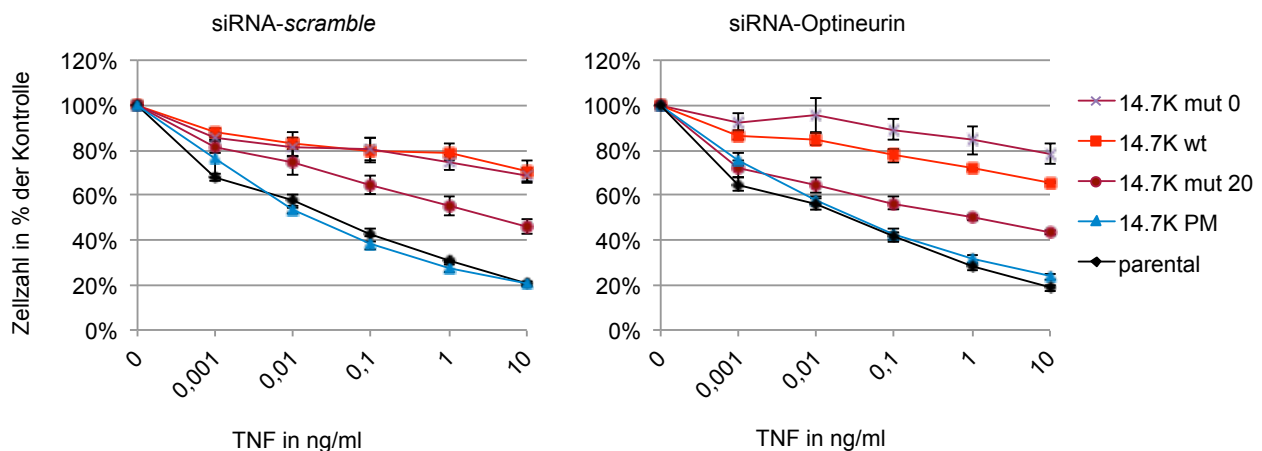


Abb. 3.16 Zytotoxizitätsassay nach Unterdrückung der Optineurin-Expression durch siRNA in H1299 und KB-Zellen

(A) H1299- und (B) KB-Zellen, die stabil 14.7K wt, 14.7K PM, mut 0 und mut 20 exprimieren, sowie parentale Zellen, wurden mit siRNA-Optineurin und siRNA-scramble transfiziert und im Zytotoxizitätsassay auf ihre Resistenz gegenüber TNF-induzierter Apoptose hin getestet. Die Suppression der Optineurin-Expression wurde im Western Blot überprüft. Die gemessenen Werte wurden auf die nur mit CHX behandelten Zellen normalisiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten. Die Western Blot-Analysen sind repräsentativ für drei unabhängigen Analysen.

Da die *siRNA-scramble* keine Zielsequenz besitzt, kann mit dieser Kontrolle gezeigt werden, ob alleine der Vorgang der siRNA-Transfektion eine Auswirkung auf die TNF-Sensitivität der Zellen oder auf die protektiven Eigenschaften der 14.7K-Varianten hat. Erwartungsgemäß hatte die Transfektion der unspezifischen siRNA keinen Einfluss. Die Ergebnisse aus Abb. 3.16 werden im Folgenden gemeinsam besprochen, da sich insgesamt für *siRNA-scramble*- und *siRNA*-Optineurin-behandelte Zellen das gleiche Bild ergibt.

Die anti-apoptotische Wirkung von 14.7K wt und mut 0 blieb in H1299- (3.16A) und KB-Zellen (3.16B) erhalten, wohingegen parentale und 14.7K PM-exprimierende Zellen sensibel auf die Behandlung mit TNF reagierten. Die Expression der Mutante mut 20 führte in H1299-Zellen zu einer Resistenz gegenüber TNF-induzierter Apoptose, in KB-Zellen ergab sich wieder die intermediäre TNF-Resistenz. Die Western Blot-Analysen in Abb. 3.16 zeigen, dass die Expression von Optineurin durch die *siRNA-scramble* nicht beeinträchtigt, durch die Optineurin-spezifische siRNA jedoch vollständig unterdrückt wurde. Der geringe Vitalitätsverlust durch den Einsatz der *siRNA*-Optineurin spiegelt sich im Zytotoxizitätsassay wider (3.16 A). Zwar änderte sich der absolute Unterschied zwischen TNF-resistenten und TNF-sensitiven Zellen nicht, in der Gesamtheit aber reagierten alle Zellen sensibler auf die TNF-Stimulation. Lag bei *siRNA-scramble* der Verlust von Zellen bei den protektiven 14.7K-Varianten bei circa 20 %, so war er bei *siRNA*-Optineurin transfizierten Zellen bei 30 %. Ebenso verschob sich aber auch das Niveau bei nicht-protektierten parentalen und 14.7K PM-exprimierenden Zellen von 60 % auf 70 %.

Zusammenfassend belegen diese Ergebnisse, dass Optineurin bei der Vermittlung des anti-apoptotischen Effekts von 14.7K wt und den weiteren protektiven Varianten keine Rolle spielt.

3.4.3 Analyse der TNFR1-Internalisierung in siRNA-Optineurin transfizierten Zellen

Da ein Effekt von 14.7K darin besteht, die Internalisierung des TNFR1 zu hemmen (Schneider-Brachert et al. 2006), sollte im Folgenden untersucht werden, ob diese Blockade auch ohne zelluläres Optineurin aufrechterhalten werden kann. Die folgenden Versuche wurden mit parentalen H1299- und H1299/14.7K wt-Zellen durchgeführt, die wie bereits beschrieben mit *siRNA-scramble* bzw. *siRNA*-Optineurin transfiziert worden waren. Die Auswertung erfolgte fluoreszenzmikroskopisch mit Hilfe konfokaler Lasermikroskopie. Die Zellen wurden 24 h nach siRNA-Transfektion auf Deckgläschen ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen eine Stunde bei 4°C mit Biotin-TNF/Streptavidin-FITC vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37°C bzw. als Kontrolle weiterhin bei 4°C. Letztere Ansätze zeigten in beiden Zelllinien und Transfektionsansätzen (Abb. 3.17 A, E, C, G) punktförmige Signale an der Zelloberfläche, die membranständigen Komplexen aus FITC-markiertem TNF und gebundenem TNF-Rezeptor entsprechen. Nach Inkubation bei 37°C kann in den parentalen H1299-Zellen eine

deutliche intrazelluläre Anhäufung des beladenen TNF-Rezeptors beobachtet werden, wobei die Abwesenheit von endogenem Optineurin keine Rolle für den Internalisierungsprozess spielt (Abb. 3.17 B, F). Bei H1299/14.7K wt-Zellen bietet sich für siRNA-*scramble* und siRNA-Optineurin transfizierte Zellen das gleiche Bild. Im Gegensatz zu parentalen Zellen, welche keinen Rezeptor mehr an der Zelloberfläche zeigen, ist dieser bei 14.7K-exprimierenden Zellen (3.17 D, H) noch deutlich zu sehen, wenn auch ein gewisser Anteil internalisiert wird. Die 14.7K-vermittelte Blockade der TNFR1-Internalisierung ist demnach von der Expression von Optineurin unabhängig.

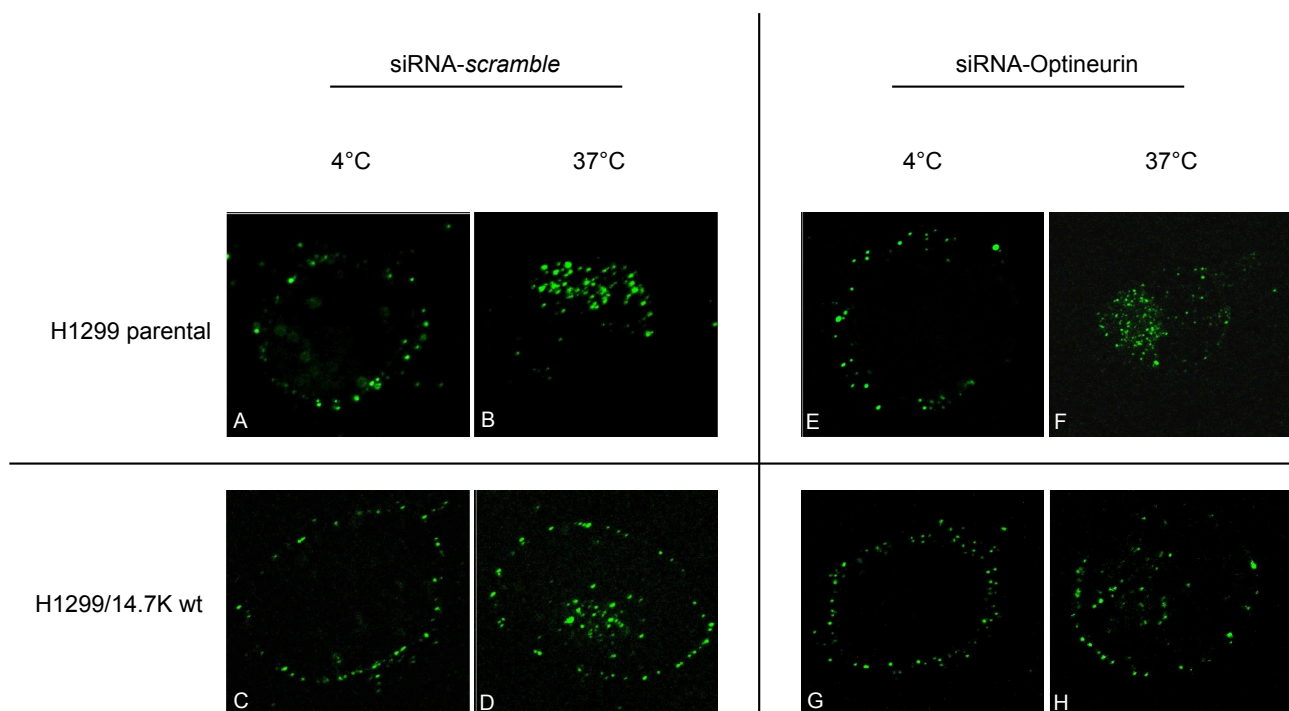


Abb 3.17 TNFR1-Internalisierung mit siRNA-Optineurin transfizierten Zellen

Parentale H1299- und H1299/14.7K wt -Zellen wurden mit siRNA-*scramble* und siRNA-Optineurin transfiziert und 24 h später auf Deckgläschen ausgesät. Die Zellen wurden am darauffolgenden Tag 1 h mit Biotin-TNF/Streptavidin-FITC zunächst bei 4°C vorinkubiert. Darauf erfolgte bei einem Ansatz eine einstündige Inkubation bei 37°C, um die Internalisierung des stimulierten Rezeptors zu ermöglichen, während ein zweiter Ansatz zur Kontrolle weiterhin auf 4°C gehalten wurde. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen aus drei unabhängigen Experimenten.

3.5 Untersuchung der Optineurin-Rekrutierung an den TNFR1 anhand magnetisch isolierter TNFR1-Komplexe

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von 14.7K und Optineurin weder für Vermittlung des anti-apoptotischen Effekts noch für die Blockade der TNFR1-Internalisierung von Bedeutung ist. Von Zhu et al. konnte aber gezeigt werden, dass Optineurin an den aktivierten TNFR1-Komplex rekrutiert wird (Zhu et al. 2007) und dort regulierend in die Aktivierung des NFκB-Signalweges eingreift. Durch Analyse magnetisch isolierter TNFR1-

Komplexe sollte nun untersucht werden, ob 14.7K die Assoziation von Optineurin an den TNFR1-Komplex beeinflusst. Die Methode zur Isolation magnetisch markierter TNFR1-Komplexe ist im folgenden Schaubild schematisch dargestellt.

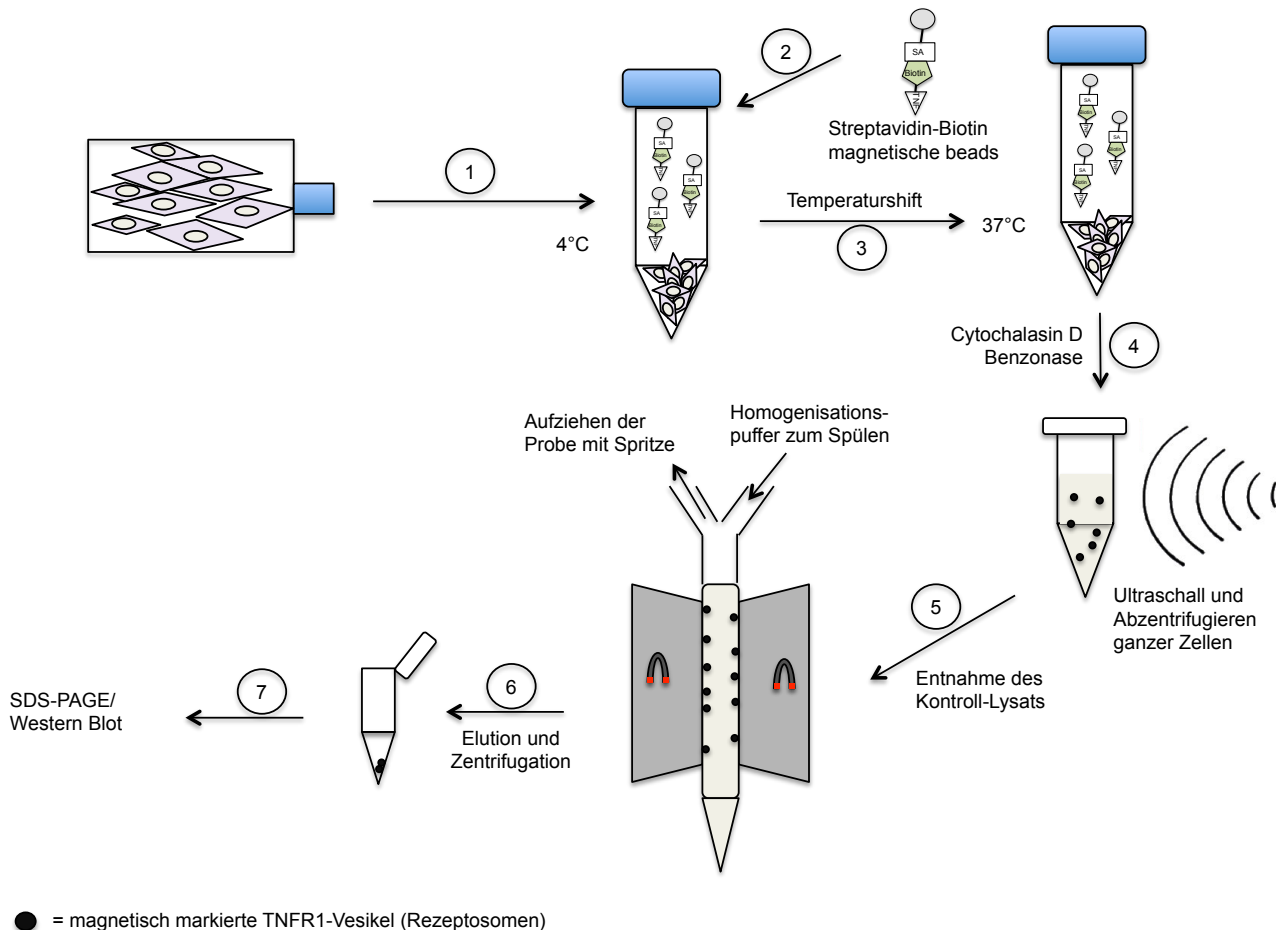


Abb. 3.18 Schema der Rezeptosomenpräparation

1) Zellen aus vier 175 cm² Zellkulturflaschen wurden trypsinisiert und über Nacht mit Vollmedium im Brutschrank gehalten, um den membranständigen Rezeptor wieder zu regenerieren. 2) Am folgenden Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Biotin-TNF und Streptavidin *magnetic-beads* für jeweils 1 h bei 4°C inkubiert. Das biotinylierte TNF lagert sich an den TNFR1 an und bildet über die Bindung mit Streptavidin die magnetische Markierung des TNFR1. 3) Der Internalisierungsschritt erfolgt durch einen Temperaturwechsel auf 37°C für die gewünschte Zeitdauer. 4) Um die Internalisierung des TNFR1 zu stoppen wurden die Zellen erst mit eiskaltem PBS, dann mit Homogenisationspuffer gewaschen und anschließend in 750 µl Homogenisationspuffer aufgenommen. In diesem Volumen wurden die Zellen mit Cytochalasin D und Benzonase behandelt und schonend mit Ultraschall homogenisiert. Dabei wurde die äußere Zellmembran zerstört, intrazelluläre Vesikel blieben indes erhalten. Noch intakte Zellen wurden anschließend abzentrifugiert. Cytochlasin D dient zur Versteifung der Aktinfilamente und erleichtert damit die Zerstörung der Zellmembran durch Ultraschallbehandlung. Benzonase erniedrigt die Viskosität des Homogenats durch Zersetzung der DNA. 5) Das Homogenat, welches nun magnetisch markierte TNFR1-Vesikel (Rezeptosomen) enthält, wird auf eine Säule aufgezogen, die sich zwischen zwei starken Magneten befindet. Hier lagern sich die Vesikel durch das Magnetfeld an die Wand der Säule an und lassen sich so isolieren. Vor der Inkubation in der Säule wurde ein Aliquot als Kontroll-Lysat entnommen. 6) Die nicht-magnetische Fraktion wurde durch Spülen mit Homogenisationspuffer von der Säule gewaschen und die magnetisch markierten Vesikel von der Säule in ein Eppendorf-Gefäß eluiert. Das nach Zentrifugation des Eluats erhaltene Pellet wurde in 0,01 % SDS resuspendiert und mit SDS-Probenpuffer versetzt. 7) Die Analyse der in der magnetischen Fraktion enthaltenen Proteine erfolgte im Western Blot.

H1299/14.7K wt- und H1299/14.7K PM-Zellen wurden bei 4°C mit Biotin-TNF und Streptavidin *magnetic-beads* für jeweils 1 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen für 3 und 10 Min. bei 37°C inkubiert und schonend durch Ultraschall homogenisiert. Aus dem Homogenat wurden magnetisch-markierte TNFR1-Rezeptosomen isoliert und im Western Blot untersucht. Als Kontrolle wurde für jeden Zeitwert ein Totallysat der homogenisierten Fraktion mit aufgetragen. Clathrin, das an der Bildung sog. „*clathrin coatet pits*“ beteiligt ist, und Dynamin 2, eine für die Abschnürung endocytotischer Vesikel von der Zellmembran verantwortliche GTPase, wurden als Markerproteine des endocytotischen Prozesses nachgewiesen. Weiterhin wurde die magnetische Fraktion auf Rekrutierung der DISC-Komponente Caspase-8, sowie zweier Adapterproteine zur Aktivierung des NFκB-Signalwegs, RIP1 und TRAF2, analysiert.

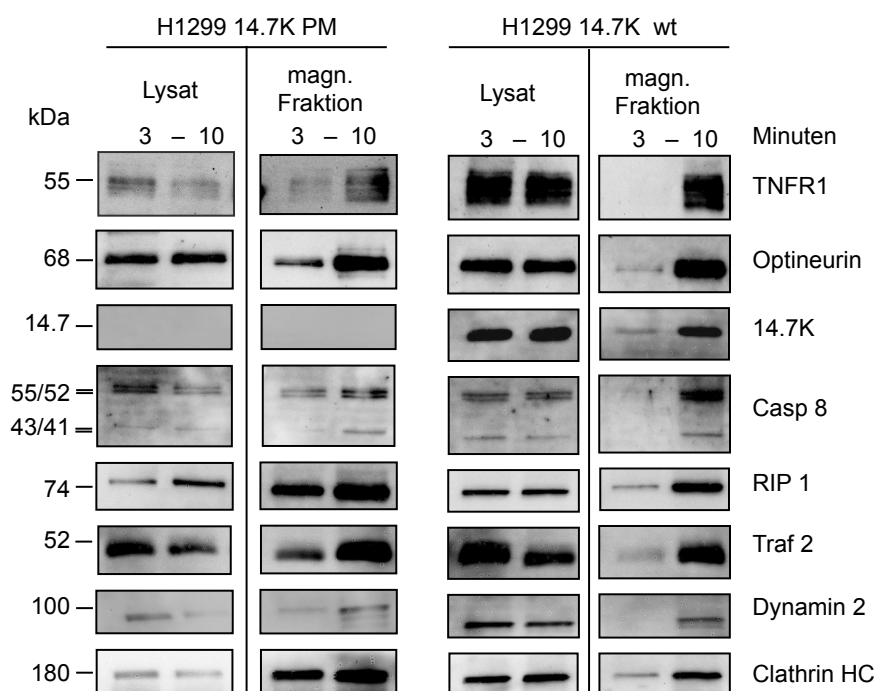


Abb. 3.19 Analyse magnetisch isolierter TNFR1-Komplexe aus H1299/14.7K wt und H1299/14.7K PM

Aus H1299/14.7K wt und H1299/14.7K PM wurden wie in Abb. 3.18 beschrieben Rezeptosomen isoliert bzw. Kontroll-Lysate gewonnen. Die Auftrennung und die Detektion der Proteine erfolgte durch SDS-PAGE/Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen die genannten Proteine.

Aus der Abbildung 3.19 ist ersichtlich, dass die Rekrutierung der Proteine an den aktivierten TNFR1 einer gewissen Reaktionskinetik unterworfen ist. In beiden Zelllinien ist allgemein eine Anreicherung der Proteine zwischen dem 3 Minuten- und dem 10 Minuten- Zeitwert zu sehen. Zudem scheint auch die Bindung von Biotin-TNF an den Rezeptor bei längeren Internalisierungsschritten erfolgreicher zu sein, da im Vergleich zum 3 Minuten-Wert der 10 Minuten-Wert eine stärkere Bande für den TNFR1 im Western Blot liefert.

Die Frage, ob Optineurin nach TNF-Stimulation in 14.7K-exprimierenden Zellen an den TNFR1 rekrutiert wird kann bejaht werden. Sowohl in TNF-sensiblen H1299/14.7K PM-Zellen als auch in den TNF-resistenten 14.7K wt-exprimierenden Zellen kommt es zur zeitabhängigen Anlagerung von Optineurin an den Rezeptor. 14.7K verhindert somit nicht die Interaktion, sondern kann sogar im Falle von 14.7K wt selbst in der magnetischen TNFR1-Fraktion nachgewiesen werden. Bezüglich 14.7K PM ist unklar, ob eine Assoziation mit dem TNFR1 nicht stattfindet oder ob das Protein zu instabil ist, um in derart geringen Mengen nachgewiesen werden zu können. Auch in vorangegangenen Experimenten gestaltete sich der Nachweis dieser Mutante als problematisch, was sich in der geringeren Intensität der Proteinbande im Western Blot widerspiegelt (Abb 3.7, Abb. 3.9). Caspase-8 als Komponente des DISC (*death inducing signaling complex*) ist bei beiden Zelllinien detektierbar, wobei die inaktive 55/52 kDa-Isoform nach 10 Min. noch dominiert. Da RIP1 und TRAF2 Internalisierungs-unabhängig an den Rezeptor assemblieren, können diese auch in beiden Zelllinien nachgewiesen werden. Die Rekrutierung von Clathrin HC und Dynamin 2 zeigt die Beteiligung der Endocytose-Maschinerie.

Die Rekrutierung von Optineurin an den TNFR1 konnte somit zum einen bestätigt werden, zum anderen konnte dargestellt werden, dass dies durch 14.7K nicht verhindert werden kann. Erstmals konnte hier gezeigt werden, dass 14.7K selbst in den TNFR1-Komplex involviert ist.

3.6 Analyse des NF κ B-Signalweges und Aktivierung von MAP-Kinasen nach TNF-Stimulation in 14.7K-exprimierenden Zellen

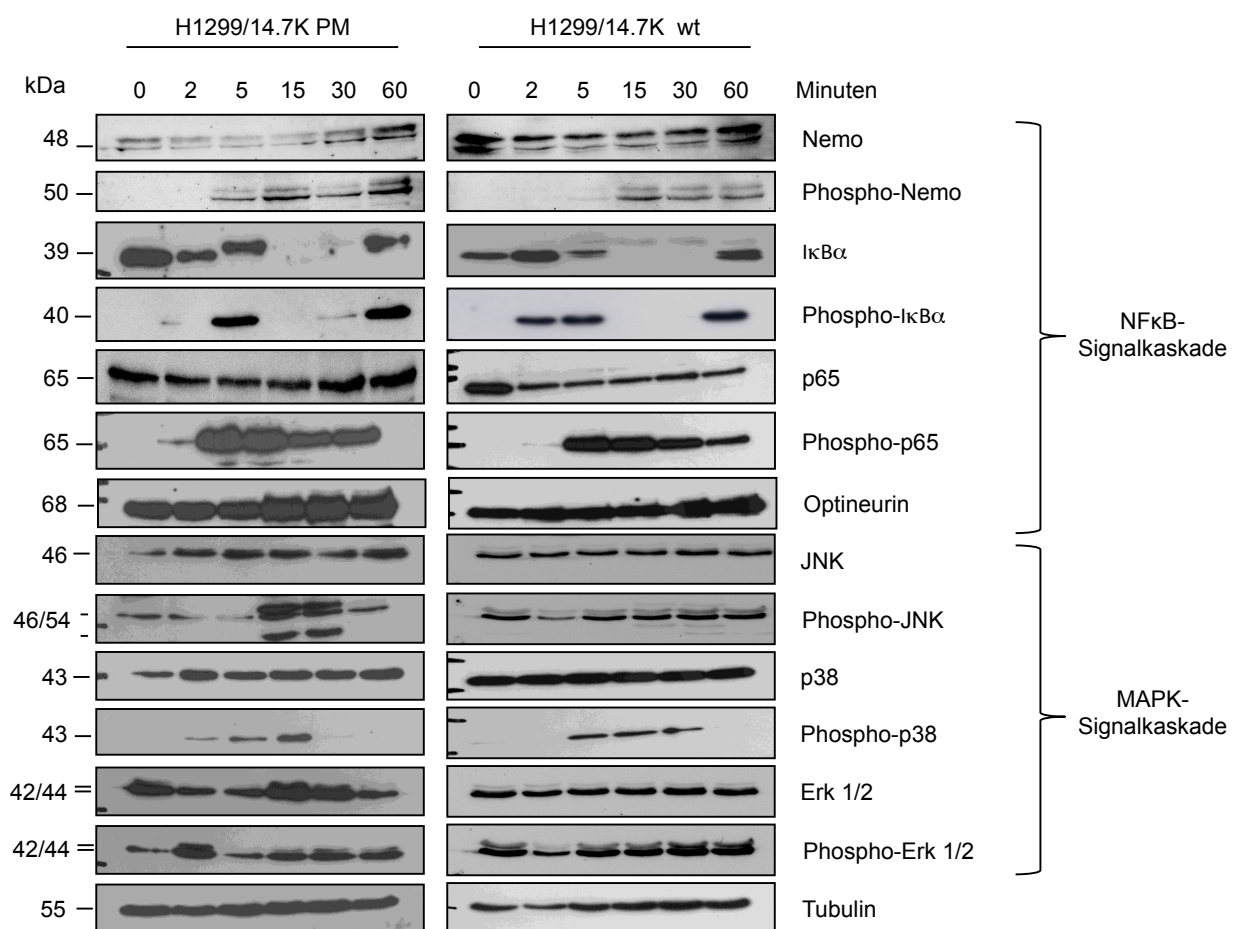
Die Bindung von TNF an seinen Rezeptor führt grundsätzlich nicht nur durch Aktivierung apikaler Caspasen zur Einleitung des programmierten Zelltods, sondern auch zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B und mitogen-aktivierter Proteinkinasen (MAPK) wie JNK, p38 und Erk 1/2 (Ashkenazi and Dixit 1998; Baud et al. 1999; Muppidi et al. 2004; Chen and Goeddel 2002a). Die Vermittlung der Apoptose durch den TNFR1 erfolgt über die Bindung von TRADD, FADD und Caspase-8, die Aktivierung des NF κ B-Signalweges und der MAP-Kinasen über die Bindung von TRADD, RIP1 und TRAF2. TRADD ist also als Adapterprotein in die Aktivierung beider Signaltransduktionswege involviert. In TRADD-defizienten Zellen ist sowohl die Aktivierung von NF κ B als auch die der Signalkaskaden von p38, JNK und Erk deutlich gehemmt (Ermolaeva et al. 2008). Schneider et al. konnten allerdings zeigen, dass die Bindung von TRADD an den TNFR1 in 14.7K wt-exprimierenden Zellen nach TNF-Stimulation stark inhibiert ist (Schneider-Brachert et al. 2006). Deshalb sollte untersucht werden, ob die Anwesenheit des adenoviralen Proteins die Aktivierung der genannten Signalkaskaden beeinflusst.

Die Untersuchung der Signalwege wurde in H1299- und KB-Zellen vorgenommen, die entweder 14.7K PM oder 14.7K wt exprimierten. Die Zellen wurden für 2, 5, 15, 30 und 60 Min. mit 20 ng/ml

TNF stimuliert und anschließend lysiert, wobei der Lysepuffer neben Protease-Inhibitoren auch Phosphatase-Inhibitoren enthielt. Zur Kontrolle wurden auch unstimulierte Zellen verwendet, die den Ist-Zustand der Zellen vor der Stimulation widerspiegeln. Gleiche Mengen der entsprechenden Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und bezüglich der Aktivierung von NF κ B und der Signalkaskaden p38, JNK und Erk im Western Blot untersucht. Optineurin wurde ebenfalls im Western Blot nachgewiesen, da die Expression von Optineurin durch TNF-Stimulation induziert werden kann (Li, Kang, et al. 1998) und dies durch 14.7K möglicherweise beeinflusst sein könnte. Die Aktivierung des Nuklear-Faktor κ B (p50/p65) erfolgt über die RIP1-abhängige Phosphorylierung der regulatorischen Kinase des IKK-Komplexes IKK γ /NEMO, welcher nach TNF-Stimulation über TRAF2 an den TNFR1 bindet. Nachfolgend kommt es zur Phosphorylierung und Degradation des NF κ B-Inhibitors I κ B α , woraufhin p65 phosphoryliert wird und vom Cytoplasma in den Zellkern transloziert. Dort bindet es zur Aktivierung der Transkription TNF-abhängiger Gene an die DNA (Hayden and Ghosh 2008).

Anhand der Abbildung 3.20 können diese Schritte nachvollzogen werden. Die Kinetik der NF κ B-Signalkaskade läuft in H1299-Zellen (3.20 A) wie folgt ab: Nach 5 Min. TNF-Stimulation erfolgt die Phosphorylierung von NEMO, I κ B α und p65 nahezu zeitgleich, wobei die Phosphorylierung von NEMO und p65 bis zum Zeitpunkt 60 Min. erhalten bleibt. Da I κ B α nach seiner Phosphorylierung ubiquitiniert und abgebaut wird, ist die entsprechende Bande in der Zeitspanne von 25 bis 30 Min. nicht detektierbar. Das erneute Erscheinen sowohl von I κ B α als auch seiner phosphorylierten Form nach 60 Min. TNF-Stimulation spricht für einen *feedback-loop*, der entweder zu einer zweiten Aktivierungswelle oder zur Terminierung der Signalkaskade durch Produktion des eigenen Inhibitors führen kann. Die sich mit der Dauer der TNF-Stimulation verstärkende Bande von Optineurin ist ein Beweis für die TNF-vermittelte Induzierbarkeit des Proteins. In KB-Zellen (3.20B) unterscheidet sich der Prozess der Aktivierung der NF κ B-Signalkaskade kinetisch von jenem in H1299-Zellen. NEMO, I κ B α und p65 sind auch hier bereits nach 5 Min. TNF-Stimulation phosphoryliert, allerdings wird dieser Zustand nur für NEMO aufrechterhalten. I κ B α wird nach der Phosphorylierung wie oben beschrieben proteasomal abgebaut und erscheint, im Gegensatz zu H1299-Zellen, nicht erneut als phosphorylierte Bande, sondern als unphosphoryliertes Protein nach 60 Min. TNF-Inkubation. Hinsichtlich des möglichen *feedback-loops* würde das die Termination der Signalkaskade nahelegen. Dafür spricht, dass auch p65 offensichtlich nach einer kurzen Aktivierungsphase wieder dephosphoryliert wird und ab 15 Min. TNF-Stimulation nur noch sehr schwach detektierbar ist. Die Induzierbarkeit von Optineurin in KB-Zellen ist mit der in H1299-Zellen vergleichbar. Die Aktivierung der NF κ B-Signalkaskade findet also sowohl in 14.7K wt- als auch in 14.7K PM-exprimierenden Zellen statt. Ebenso wird die TNF-induzierte Expression von Optineurin durch seinen viralen Interaktionspartner 14.7K nicht beeinträchtigt.

A)



B)

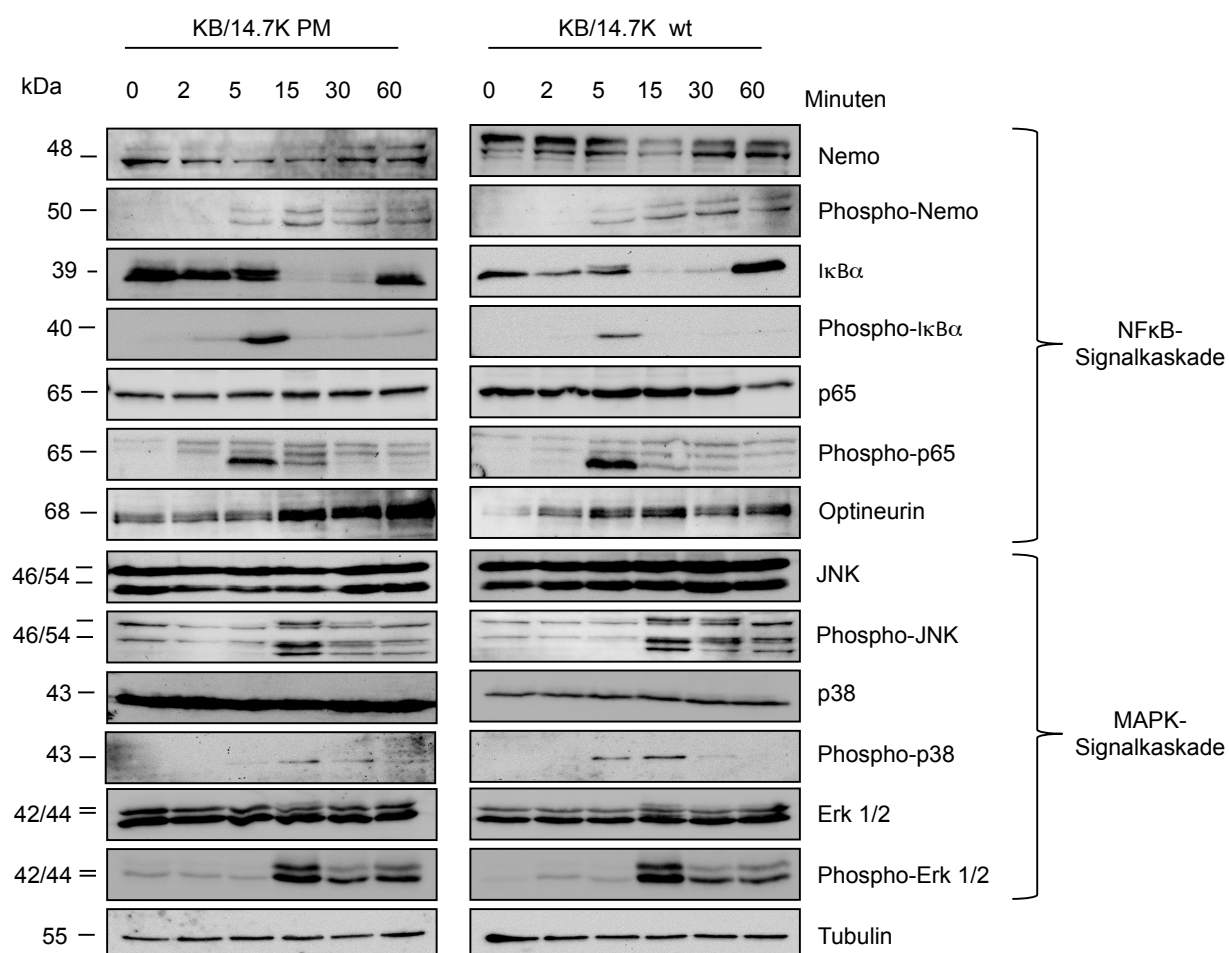


Abb. 3.20 Analyse der NFκB- und MAPK-Aktivierung nach TNF-Stimulation

Die Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit 20 ng/ml TNF stimuliert und anschließend lysiert. Nach Auftrennung der Zell-Lysate mittels SDS-PAGE wurden die angeführten Proteine im Western Blot detektiert.

Bei der Aktivierung der Kinase JNK zeigten sich in der Zelllinie H1299 Unterschiede zwischen 14.7K PM- und 14.7K wt-exprimierenden Zellen. Nach 15-30 Min. TNF-Stimulierung kann bei H1299/14.7K PM deutlich die phosphorylierte Kinase detektiert werden, während in H1299/14.7K wt die Kinase zu diesen Zeitpunkten sehr viel schwächer phosphoryliert ist. Unterschiede in der Phosphorylierungs-Kinetik können auch bei der Aktivierung der MAP-Kinase p38 festgestellt werden. In H1299/14.7K PM wird die phosphorylierte Bande in der Zeitspanne zwischen 2 und 15 Min. nach TNF-Behandlung sichtbar. In H1299/14.7K wt ist die Aktivierungskinetik nach hinten verschoben und die aktivierte Kinase im Zeitraum von 5-30 Min. nach Stimulation zusehen. Die Kinase Erk 1/2 scheint in H1299-Zellen permanent aktiviert zu sein und zeigt in beiden H1299-Zelllinien keine Reaktion auf die Zytokin-Stimulation.

Im Unterschied zu H1299-Zellen wird JNK sowohl in 14.7K PM- als auch in 14.7K wt-exprimierenden KB-Zellen nach 15 Min. TNF-Behandlung phosphoryliert, wobei die Phosphorylierung in KB/14.7K wt weitere 45 Min. anhält, während sie in KB 14.7K PM schon nach 15 Min. deutlich schwächer wird. Die Kinetik der Aktivierung der Kinase p38 unterscheidet sich in im Falle der KB-Zellen nicht. Die phosphorylierte Bande ist im Zeitraum von 5-30 Min. detektierbar. Erk 1/2 liegt in KB-Zellen im Unterschied zu H1299-Zellen nicht permanent in phosphoryliertem Zustand vor, ist über TNF aktivierbar, denn 15 Min. nach Stimulation wird die phosphorylierte Erk 1/2-Bande im Western Blot sichtbar. Die Anwesenheit von 14.7K wt hat auf diesen Vorgang keinen Einfluss, wie das dargestellte Bandenmuster zeigt.

Abschließend kann also festgestellt werden, dass 14.7K höchstens in H1299-Zellen einen Einfluss auf die JNK-Signalkaskade hat, im Wesentlichen aber weder die Aktivierung von NF κ B noch die der MAP-Kinasen beeinträchtigt.

4. Diskussion

Das adenovirale Protein 14.7K besitzt die Fähigkeit, nicht nur im Kontext einer Virusinfektion, sondern auch als singular exprimiertes Protein, Zellen vor TNF-induzierter Apoptose zu schützen. Dieser Effekt wurde im Laufe der Jahre mehrfach beschrieben (Gooding 1988; Horton et al. 1991; Burgert and Blusch 2000) und konnte auch in Experimenten im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Der zugrunde liegende Mechanismus ist aber bis heute nicht völlig geklärt. Einblicke in die Wirkungsweise des Proteins konnten durch Arbeiten von Schneider et al. und Schütze et al. gewonnen werden, bei denen die Abhängigkeit von TNFR1-Internalisierung und DISC-Rekrutierung zur Induktion der Apoptose gezeigt werden konnte (vgl. 1.2.1) (Schneider-Brachert et al. 2004; Schütze et al. 1999). Sie identifizierten dabei eine Domäne innerhalb des Rezeptors, die sog. TRID, *TNF-receptor internalization domain*, die für die Internalisierung des Rezeptors und die Anlagerung des DISC an die Todesdomäne des Rezeptors essentiell ist. Nachdem in 14.7K-exprimierenden Zellen ebenfalls eine Blockade der TNFR1-Internalisierung festgestellt werden konnte, lag es nahe, auch die Rekrutierung der DISC-Adapterproteine zu überprüfen. Tatsächlich verhindert 14.7K die Assemblierung des DISC und somit die Aktivierung des Zelltodprogrammes durch Caspase-8 (Schneider-Brachert et al. 2006). Die mechanistische Grundlage dieser Effekte ist jedoch noch ungeklärt, da man 14.7K selbst keine direkte Interaktion mit einem der beteiligten Proteine oder dem Rezeptor nachweisen konnte. Hinweise auf den Wirkmechanismus von 14.7K sollte die Charakterisierung intrazellulärer Bindungspartner geben, von denen bislang vier identifiziert wurden. Wie in der Einleitung dargelegt (siehe 1.4 und 1.5), war Optineurin der wahrscheinlichste Kandidat zur Vermittlung des anti-apoptotischen Effekts, da es als TNF-induzierbares Protein eine Rolle in der Aktivierung und Regulierung von NF κ B spielt und durch weitere Bindungspartner in Prozesse der Endo- und Exocytose eingebunden ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Optineurin TNF-abhängig an den TNFR1 rekrutiert wird, wo es mit NEMO, einem weiteren Bindungspartner von 14.7K, um die Bindung an RIP1 konkurriert (Zhu et al. 2007).

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Charakterisierung der Interaktion von 14.7K mit Optineurin mit dem Ziel, zu klären, ob die Interaktion von 14.7K mit Optineurin für die anti-apoptotische Funktion des viralen Proteins von Bedeutung ist und ob sich daraus Hinweise auf den Wirkungsmechanismus von 14.7K ableiten lassen. Daraus ergibt sich gegebenenfalls ein besseres molekulares Verständnis der TNF/TNFR1-assoziierten Signaltransduktionswege.

4.1 Die Proteinstruktur von 14.7K

Die Sequenz von 14.7K besitzt keine Homologie zu anderen bekannten Sequenzen, so dass die 14.7K-Proteine der verschiedenen Adenoviren eine neue Klasse von Proteinen bilden. Aus der Sequenz der Aminosäuren lassen sich keine bekannten Motive ableiten und das Fehlen spezieller Domänen macht es schwierig, bestimmte Funktionen bestimmten Regionen zuzuweisen. In der folgenden Abbildung sind die Ergebnisse der Interaktionsanalysen der 14.7K-Varianten mit Optineurin (siehe 3.2) und der TNF-Resistenz der getesteten Mutanten (siehe 3.3.2) mit der Strukturvorhersage für 14.7K zusammengefasst.

PHD/PSIPRED													
<div> <div> <div>1</div> <div>10</div> <div>20</div> <div>30</div> <div>40</div> <div>50</div> <div>60</div> </div> <div> <div>α1</div> <div>β1</div> <div>β2</div> </div> </div>													
Ad5	.MTDTLDD	LEM	DGI	I	TE	OR	LL	E	RR	RA	AA	E	Q
Ad1	.MTDGLDD	LEM	DGI	I	TE	OR	LL	Q	RR	KA	AA	E	Q
Ad2	.MTESLDD	LEM	DGI	I	TE	OR	LL	E	RR	KA	AA	E	Q
	mut 0	mut 1	mut 2	mut 3	mut 4	mut 5	mut 6	mut 7	mut 8	mut 9	mut 10	mut 11	mut 12
Mammalian two Hybrid	ja	ja	ja	ja	ja	ja	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein
Co-Immunpräzipitation	ja	ja	ja	ja	ja	ja	nein	ja	ja	ja	nein	nein	nein
TNF-Resistenz	ja	n.d.	nein	nein	n.d.	nein	n.d.						

PHD/PSIPRED													
<div> <div> <div>70</div> <div>80</div> <div>90</div> <div>100</div> <div>110</div> <div>120</div> </div> <div> <div>β3</div> <div>β4</div> <div>β5</div> <div>β6</div> <div>α2</div> </div> </div>													
Ad5	..HRLSYK	LPT	KR	Q	K	L	V	M	V	G	E	K	P
Ad1	..HRLSYK	LPA	K	R	Q	K	L	L	M	V	G	E	R
Ad2	..NRLSYK	LPT	Q	R	Q	K	L	V	L	M	V	G	E
	mut 13	mut 14	mut 15	mut 16	mut 17	mut 18	mut 19	mut 20	mut 21	mut 22	mut 23	mut 24	
Mammalian two Hybrid	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	
Co-Immunpräzipitation	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
TNF-Resistenz	n.d.					nein	nein	ja, intermediär	nein	n.d.	14.7K PM nein	n.d.	

Abb. 4.1 Vergleich von Proteinstruktur und Interaktionsfähigkeit von 14.7K mit Optineurin

Dargestellt sind die 14.7K-Sequenzen der Adenovirus-Serotypen 5, 1, und 2. Die Aminosäuresequenz ist zwischen den Serotypen hochkonserviert. Die wichtigen Cysteine an den Positionen 44, 50 und 119 sind durch eine orange Umrandung markiert. Eingezeichnet sind die in dieser Arbeit verwendeten Mutanten. Ergebnisse aus Mammalian Two-Hybrid Assay und Co-Immunpräzipitation sind den Mutanten zugeordnet. Sofern vorhanden sind auch die Ergebnisse zur TNF-Resistenz angegeben. Oberhalb der Sequenz sind *in silico* vorhergesagt Sekundärstrukturelemente angegeben. (n.d. = nicht durchgeführt).

Die Kompaktheit der Struktur führt dazu, dass nahezu jede Mutation zu einem Funktionsverlust führt, der höchstwahrscheinlich auf einer Veränderung der Tertiärstruktur basiert.

4.1.1 Zusammenhang von Proteinstruktur und Interaktion mit Optineurin

Vergleicht man das Interaktionsverhalten der 14.7K-Varianten in Mammalian Two-Hybrid Assay (Abb. 3.8) und in der Co-Immunpräzipitation (Abb. 3.9), so kann festgestellt werden, dass hauptsächlich Mutationen im C-terminalen Bereich von 14.7K zu einem Bindungsverlust führen. Dies entspricht hinsichtlich der Proteinstrukturanalyse etwa dem Bereich ab dem Strang des ersten β -Faltblatts (Abb.4.1).

Aber auch Veränderungen in der Aminosäuresequenz der N-terminalen α -Helix können zum Interaktionsverlust führen, wie die Mutante mut 6 (Abb. 3.8 und 3.9) beweist. Dies spricht für die Hypothese von Kim und Foster (Kim and Foster 2002), welche nahelegt, dass Aminosäuren aus verschiedenen Bereichen des Proteins an der Interaktion beteiligt sind und es sich daher eher um ein strukturelles statt lineares Bindemotiv handelt.

Bezüglich der Interaktionsfähigkeit der 14.7K-Varianten mit C-terminaler Mutation, ab 14.7 mut 8, finden sich Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen aus Mammalian Two-Hybrid Assay und Co-Immunpräzipitation. Die Mutanten mut 8, mut 9 und mut 13 treten im Mammalian Two-Hybrid Assay als Nicht-Binder auf, während sie in der Co-Immunpräzipitation zusammen mit Optineurin präzipitiert werden können. Genau andersherum verhält es sich mit den Mutanten mut 17 und mut 20. Diese Unterschiede müssen auf Assay-spezifische Rahmenbedingungen zurückzuführen sein. Der Mammalian Two-Hybrid Assay beruht auf dem Zusammenspiel der Fusionsdomänen p65 (Aktivierungs-Domäne) und GAL4 (DNA-Bindungsdomäne) und der darauffolgenden Expression einer Reporter-Luciferase. Durch einen starken CMV-Promotor werden die Proteine überexprimiert und liegen damit in unphysiologischen Mengen in der Zelle vor. Zudem werden die Proteine durch die in den Vektoren enthaltene nukleare Lokalisations-Sequenz (NLS) in ein gemeinsames Kompartiment, den Zellkern, gezwungen, ob sie ursprünglich darin vorkommen oder nicht. Die Größe des fusionierten *Tags* kann zudem besonders bei kleinen Proteinen wie 14.7K ein Problem sein, da dadurch die korrekte Proteinfaltung beeinträchtigt werden könnte, funktionelle Bereiche verdeckt oder im Gegenteil besonders herausgestellt werden könnten. Die Aktivierungsdomäne ist mit 20 kDa circa eineinhalb Mal so groß wie 14.7K.

Bei der Co-Immunpräzipitation werden die Interaktionspartner ebenfalls überexprimiert, so dass in diesem Aspekt kein Unterschied zwischen den beiden Methoden besteht. Allerdings wurde hier nur eines der beiden Proteine, nämlich Optineurin, mit einem nur 1,1 kDa großen HA-Tag versehen, während 14.7K unmarkiert blieb. Zudem beruht die Interaktion der Proteine auf ihrer tatsächlichen Komplexbildung, wie sie innerhalb der Zelle zustande kommt. Prinzipiell sollten die Proteine auch ihre natürliche subzelluläre Lokalisation aufweisen, wobei dies im Hinblick auf die Überexpression durchaus kritisch betrachtet werden kann. Dennoch werden sie hier nicht wie im Falle des Mammalian Two-Hybrid Assay durch eine spezielle Sequenz auf einen subzellulären Bereich festgelegt. Insgesamt ist davon auszugehen, dass die Co-Immunpräzipitation eine weniger artifizielle Methode ist und den realen Interaktionszustand besser abbildet. Für die Interaktion von

14.7K mit Optineurin ist demnach der C-Terminus von 14.7K verantwortlich, wobei Mutationen im C-terminalen Teil ab etwa Position 50 zum Verlust der Interaktionsfähigkeit führen. Einzige Ausnahme bildet hier die Mutante mut 13, deren genauere Charakterisierung Hinweise auf die Faltung von 14.7K geben könnte, da es sich vielleicht um eine Proteinregion handelt, welche beispielsweise nach innen gefaltet ist und somit nicht direkt an der Bindung zu Interaktionspartnern beteiligt ist.

Auffällig sind die abweichenden Bandengrößen der Mutanten mut 21 bis 24 im Western Blot (Abb. 3.9). Nach Abgleich mit der vorhergesagten Proteinstruktur (Abb.4.1) betreffen diesen Mutationen die C-terminale α -Helix, von der man in diesem Zusammenhang vermuten kann, dass sie Ziel posttranslationaler Modifikationen sein könnte.

4.1.2 Zusammenhang von Proteinstruktur und TNF-Resistenz

Nach Studien von Ranheim et al. ist die Erhaltung der Proteinstruktur für die Funktion von großer Wichtigkeit, da hier nahezu jede Veränderung zum Funktionsverlust führt. Schon die Mutation oder Deletion eines der hochkonservierten Cysteine an Position 44, 50 und 119 macht das Protein funktionslos. Nach Kim und Foster sind diese Cysteine an der Bindung von Zink-Ionen beteiligt, die in einer 1:1-Stöchiometrie von 14.7K gebunden werden (Kim and Foster 2002). Es besteht die Möglichkeit, dass die Stabilität des Proteins davon beeinflusst wird, wie an der meist geringen Bandenintensität der hier verwendeten 14.K PM (Position 119 Cystein zu Serin) im Western Blot zu beobachten war (Abb. 3.9 und Abb. 3.11). Dagegen spricht aber, dass die Mutanten mut 8, mut 9 und mut 23 gut exprimiert und nachgewiesen werden konnten, obwohl die betreffenden Cysteine ausgetauscht wurden. Es verlangt daher noch weiterführende Forschungen, um die funktionelle Bedeutung der Metallionen-Bindung besser zu verstehen.

In der vorliegenden Arbeit konnten zwei Mutanten (mut 0 und mut 20) mit anti-apoptotischer Funktion identifiziert werden, was beweist, dass nicht jede Mutation einen Funktionsverlust zur Folge haben muss. Mit Blick auf die vorhergesagte Proteinstruktur kann man diesen Effekt aber möglicherweise damit erklären, dass eine Veränderung der Aminosäuren am äußersten N-Terminus und noch außerhalb der α -Helix, wie im Falle von mut 0, höchstwahrscheinlich keine gravierende Veränderung der Tertiärstruktur verursacht. Auch mut 20 liegt in einer Region, die das Zwischenstück zwischen der letzten β -Faltblattstruktur und der C-terminalen α -Helix bildet und somit vielleicht nicht direkt an der funktionalen Strukturbildung beteiligt ist.

Nach Chen et al. inhibiert 14.7K durch direkte Bindung der Initiator-Caspase-8 die Einleitung der TNF-induzierten Apoptose (Chen et al. 1998). Auch Kim und Foster konnten in einem GST-Pull-down-Experiment zeigen, dass sowohl 14.7K wt als auch eine N-terminale Deletionsmutante 14.7K Δ 1-31 mit der DED (*death effector domain*) der Caspase-8 interagieren konnte. Nachdem letztere Mutante aber nicht fähig war die Apoptose zu verhindern, scheint allein die Bindung der

DED für die Inhibition der Caspase-8-Aktivierung nicht ausreichend zu sein. Außerdem ist eine funktionelle Bedeutung des N-Terminus von 14.7K nicht auszuschließen, da auch Mutanten mit intaktem C-Terminus, wie mut 2, mut 3 oder mut 5, nicht mehr protektiv sind.

4.2 Korrelation von Zytotoxizitätsassay und Caspase-8-Aktivität

Im Zytotoxizitätsassay wurden die stabil in zwei Zelllinien exprimierten 14.7K-Varianten auf ihre Fähigkeit getestet, Zellen vor TNF-induzierter Apoptose zu schützen (Abb. 3.12). Da die Initiator-Caspase-8 in der TNF-induzierten Apoptose aktiviert wird, ist davon auszugehen, dass ihre Aktivierung in 14.7K-exprimierenden Zellen gehemmt ist. Um dies zu überprüfen und festzustellen, ob dieser Mechanismus in den protektiven 14.7K-Varianten ebenso funktioniert, wurde die Caspase-8-Aktivität in diesen Zellen bestimmt. Die nachfolgende Tabelle fasst die Ergebnisse zur Interaktion der 14.7K-Varianten mit Optineurin zusammen und gibt einen Überblick bezüglich TNF-Resistenz und Caspase-8-Aktivität.

Tabelle 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse zu Interaktion, TNF-Resistenz und Caspase-8-Aktivität

Konstrukt	Interaktion mit Optineurin		TNF -Resistenz im Zytotoxizitätsassay		Caspase-8-Aktivität	
	Mammalian two-Hybrid	Co-IP	H1299	KB	H1299	KB
14.7K wt	ja	ja	ja	ja	gering	gering
14.7K PM	nein	nein	nein	nein	hoch	hoch
14.7K mut 0	ja	ja	ja	ja	gering	intermediär
14.7K mut 2	ja	ja	nein	n.d.	n.d.	n.d.
14.7K mut 3	ja	ja	nein			
14.7K mut 5	ja	ja	nein			
14.7K mut 18	nein	nein	nein			
14.7K mut 19	nein	nein	nein			
14.7K mut 20	ja	nein	ja	intermediär	gering	intermediär
14.7K mut 21	nein	nein	nein	nein	n.d.	n.d.

In H1299-Zellen lassen sich die 14.7K-Varianten im Zytotoxizitätsassay in eine protektive und eine nicht-protektive Gruppe (Abb. 3.12A) einteilen. Die Messung der Caspase-8-Aktivität der TNF-resistenten Zellen (H1299/14.7K wt, mut 0 und mut 20) ergab eine deutliche Hemmung der Aktivierung im Vergleich zu nicht-protektierten parentalen oder H1299/14.7K PM-Zellen. Die gemessenen Caspase-8-Aktivitäten der protektiven 14.7K-Varianten befanden sich dabei auf einem Niveau mit 14.7K wt. Die Resistenz gegenüber TNF-vermittelter Apoptose konnte hier gut mit der Inhibition der Caspase-Aktivierung korreliert werden.

Diese Ergebnisse konnten weitgehend in einer zweiten Zelllinie, der Tumorzelllinie KB, bestätigt werden. Im Zytotoxizitätsassay erwies sich neben 14.7K wiederum die Mutante mut 0 als ähnlich protektiv wie 14.7K wt. Mut 20 hingegen zeigte in diesen Zellen eine intermediäre TNF-Resistenz (Abb. 3.12B). Bei der Messung der Caspase-8-Aktivität in diesen Zellen wäre deshalb zu erwarten gewesen, dass mut 0 und 14.7K wt eine stärkere Hemmung der Caspase-8-Aktivität aufweisen als die weniger protektive Variante mut 20. Dies war jedoch nicht der Fall. Vielmehr zeigten mut 0 und mut 20 gleiche Caspase-8-Aktivität, die doppelt so hoch war, wie die von 14.7K wt (Abb. 3.13B). Demnach wären also beide Mutanten gleich protektiv. Die Caspase-Aktivitätsmessung korreliert also im Fall der Mutante mut 0 nicht mit dem im Zytotoxizitätsassay beobachteten Phänotyp. Trotz der, wenn auch moderaten, Caspase-8-Aktivierung kommt es in KB-Zellen zur gleichzeitigen Inhibierung der Apoptose. Für diesen unerwarteten Effekt könnten Besonderheiten der verwendeten Tumorzelllinie verantwortlich sein, die als solche eine gewisse Apoptose-Resistenz besitzen muss (Hanahan and Weinberg 2000). Es wäre daher überaus interessant, weitere *downstream*-Caspasen und die Aktivität anderer Apoptose-Regulations-Faktoren zu testen, um festzustellen, ob eine Blockade des Apoptoseprogramms durch 14.7K auch auf Ebene der Effektor-Caspasen Caspase-9 oder -3 stattfinden kann. Li et al. konnten zeigen, dass auch die Transfektion der cytoplasmatischen TNFR1-Domäne zur Auslösung der Apoptose führt und diese durch 14.7K blockiert werden kann. Daher ist es wahrscheinlich, dass 14.7K auf verschiedene Weise in diese apoptotischen Prozesse eingreift.

4.3 Beteiligung von Optineurin und 14.7K an zellulären Prozessen

Um die Interaktion von Optineurin und 14.7K funktionell besser verstehen zu können ist es wichtig, die von Optineurin beeinflussten zellulären Prozesse und seine Rolle darin besser zu verstehen. Optineurin wurde bislang mit folgenden 3 Prozessen in Verbindung gebracht:

- 1) Endocytose und intrazellulärer Vesikeltransport
- 2) Apoptose
- 3) NF κ B-Signaling

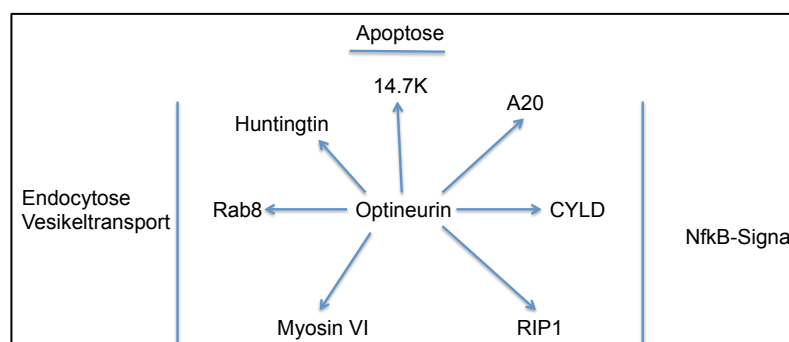


Abb. 4.2 Schematische Darstellung von Optineurin und seinen Interaktionspartnern
Verschiedene zelluläre Funktionen können mit den interagierenden Proteinen assoziiert werden.

4.3.1 Interaktion von 14.7K und Optineurin bei der Endocytose und vesikulären Transportprozessen

Vesikuläre Transportprozesse zwischen Golgi-Apparat und Plasmamembran sind in der Zelle auf komplexe Weise reguliert. Das Gleichgewicht von endo- und exocytotischen Prozessen wird dabei durch das sog. „*vesicular trafficking*“ aufrechterhalten, wodurch z.B. internalisierte Rezeptoren über *Recycling*-Vesikel zurück an die Plasmamembran gebracht werden können. Die Veränderung regulierender Komponenten hat somit weitreichende Folgen für die Organisation der Zellorganellen, die Zellmorphologie und die Signaltransduktion.

Optineurin ist durch drei seiner Interaktionspartner, Rab8, Myosin VI und Huntingtin, sowohl in Prozesse der Rezeptor-Endocytose, wie auch in vesikuläre Transportprozesse von trans-Golgi-Kompartimenten an die Plasmamembran involviert (Li et al. 1997; Swarup and Nagabhushana 2010; Chalasani et al. 2009). Überexpression sowie siRNA-vermittelte Suppression der Optineurin-

Expression führten zu einer veränderten Morphologie und Fragmentierung des Golgi-Apparates und zur Beeinträchtigung des Vesikeltransports bei der Endo- und Exocytose. Sahlender et al. erstellten daraufhin ein Modell, in dem Optineurin in einem Komplex einerseits Golgi-assoziiertes Rab 8 mit Myosin VI und damit auch dem Aktinskelett verbindet, andererseits über Huntingtin und dessen Interaktionsprotein HAP1 (Huntingtin Associated Protein 1) einen Kontakt zum mikrotubulären Netzwerk herstellt (Sahlender et al. 2005). Rab 8 könnte in dieser Konstellation über Optineurin mit

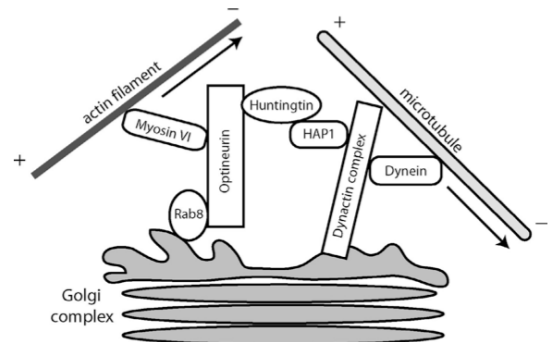


Abb.4.3 Schematische Darstellung eines Proteinkomplexes aus Optineurin und seinen Interaktionspartnern Myosin VI, Rab 8 und Huntingtin.
Nach Sahlender et al. 2005

Myosin VI interagieren und dadurch trans-Golgi-Vesikel über kurze Distanzen entlang der Aktinfilamente transportieren, bevor sie als Rab 8-positive *Recycling*-Vesikel an die Plasmamembran gebracht werden (Ang et al. 2003). Huntingtin gilt als Koordinator des Dynein-vermittelten Transports von Endosomen und Lysosomen (Caviston et al. 2010).

Das adenovirale Protein 14.7K greift ebenfalls in endocytotische Prozesse ein, indem es die Internalisierung des TNFR1 nach TNF-Stimulation blockiert. Nach Schneider et al. wurde dazu die Rekrutierung verschiedener Komponenten der Endocytose-Maschinerie, wie Dynamin II und Rab 5, an die Plasmamembran verhindert, während Clathrin offensichtlich dennoch an der Zellmembran assemblierte (Schneider-Brachert et al. 2006). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten zwar den zentralen Aspekt, nämlich die Inhibierung der TNFR1-Internalisierung bestätigen (Abb. 3.17), eine Hemmung der Dynamin II-Rekrutierung aber nicht zeigen (Abb. 3.19). Da die Interaktion von 14.7K mit Optineurin über dessen C-Terminus vermittelt wird, ist eine Beeinträchtigung der Rab 8-Optineurin-Bindung unwahrscheinlich (vgl. Abb. 1.9). Dennoch sollte

z.B. mittels Co-Immunpräzipitation überprüft werden, ob die Bindung von Optineurin zu Rab 8 durch die Anwesenheit von 14.7K beeinflusst wird, oder, ob beide Proteine gleichzeitig mit Optineurin interagieren können. Funktionell könnte zudem in diesem Kontext kontrolliert werden, ob dies zu einer Delokalisierung Rab 8-positiver Vesikel führt. Durch Expression von GFP-markiertem-Rab 8 wäre es möglich, die intrazelluläre Verteilung des Proteins in 14.7K wt- und, zur Kontrolle, in 14.7K PM-exprimierenden Zellen im Fluoreszenzmikroskop zu visualisieren.

Ebenso könnte sich ein Verlust der Myosin VI- und Huntingtin-Interaktion mit Optineurin auf die Internalisierung des Rezeptors an die Zelloberfläche auswirken. Untersuchungen der Endocytose des Transferrin-Rezeptors (TfR) zeigten eine verringerte Aufnahme des Rezeptors nach Suppression der Expression von Optineurin durch siRNA (Park et al. 2010). Demnach wäre ein Modell denkbar, bei dem Optineurin von 14.7K aus dem Myosin VI-Huntingtin-Komplex (siehe 4.3) verdrängt wird, was auch die Internalisierung des TNFR1 blockieren könnte. Der FITC-TNF-markierte TNFR1 sollte demgemäß in siRNA-Optineurin-behandelten Zellen an der Zelloberfläche verbleiben. Die konfokalmikroskopische Analyse der TNFR1-Internalisierung in Optineurin-supprimierten H1299-Zellen ergab jedoch ein anderes Bild. Die Internalisierung zeigte sich in parentalen Zellen unabhängig von der Abwesenheit endogenen Optineurins (Abb. 3.17). Auch die 14.7K-vermittelte Blockade der Rezeptor-Internalisierung wurde durch die Suppression von Optineurin nicht beeinträchtigt. Insgesamt sprechen diese Beobachtungen gegen eine Beteiligung von Optineurin am Prozess der TNFR1-Internalisierung und der 14.7K-bedingten Blockade. Möglicherweise handelt es sich hier um einen Zelltyp-abhängigen Effekt, denn die Studien zur Endocytose des TfR wurden in retinalen Zelllinien (RGC, RPE) durchgeführt, während dieser Effekt in HeLa-Zellen nicht beobachtet werden konnte (Nagabhushana et al. 2010). Darüberhinaus besteht die Möglichkeit, dass die Funktionen von Optineurin im Rahmen der Endocytose von anderen Proteinen übernommen werden können, so dass sich der *knock-down* von Optineurin phänotypisch nicht auswirkt.

4.3.2 Die Funktion von Optineurin in apoptotischen Prozessen

Erste Hinweise auf eine mögliche anti-apoptotische Funktion von Optineurin gab es, als eine mutierte Form des Proteins (E50K) mit dem Glaukom, einer neurodegenerativen Augenkrankheit, assoziiert wurde (Rezaie et al. 2002). Zellen mit mutiertem Optineurin (Mutation E50K) starben infolge oxidativen Stresses durch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, **Reactive Oxygen Species**) und der daraus resultierenden mitochondrial aktivierten Apoptose. Es konnte zudem festgestellt werden, dass in den von der Neurodegeneration betroffenen okularen Geweben TNF und TNFR1 verstärkt exprimiert wurden (Yuan and Neufeld 2000).

In Einklang damit stehen die Forschungsergebnisse von De Marco et al., die beweisen konnten, dass die Überexpression von Optineurin murine Fibroblasten (NIH 3T3) vor oxidativem Stress

durch Wasserstoffperoxid schützte und die Freisetzung von Cytochrom c in diesen Zellen gehemmt war (De Marco et al. 2006). Da die Expression von Optineurin durch TNF induziert werden kann, vermutete man, dass Optineurin zur Gegenregulierung der TNF-induzierten Apoptose dienen könnte (Schwamborn et al. 2000). Passend dazu konnte auch in HeLa-Zellen, einer Cervix-Karzinom-Zelllinie, die TNF-induzierte Apoptose durch die Überexpression von Optineurin inhibiert werden (Li et al. 1997).

Die Verwendung von RGC-Zellen (**R**etinal **G**anglion **C**ells), einer Linie retinaler Ganglion-Zellen, ermöglichte es, den protektiven Effekt von Optineurin auf Nervenzellen in einem passenderen Zell-Hintergrund zu untersuchen. In RGC-Zellen war schon die Expression der E50K-Mutante zur vermehrten Produktion von ROS in den Zellen ausreichend. Die Zugabe von TNF führte sowohl in Optineurin-E50K- wie auch in Optineurin wt-exprimierenden Zellen zum Tod (Chalasani et al. 2007). Optineurin wirkt somit in RGC-Zellen nicht protektiv gegenüber TNF-induzierter Apoptose. Unter bestimmten Bedingungen kann Optineurin also tatsächlich als Zell-protektives Protein betrachtet werden, kann aber nicht generell als anti- oder pro-apoptotisch eingestuft werden, da diese Effekte offensichtlich vom jeweiligen Zelltyp abhängen.

Li et al. zeigten, dass auch HEK293-Zellen durch 14.7K vor TNF-induzierter Apoptose geschützt werden können. Die Apoptose induzierten sie durch Transfektion der cytoplasmatischen Domäne des TNFR1. In einer Co-Transfektion von 14.7K, Optineurin und der cytoplasmatischen TNFR1-Domäne konnten sie zeigen, dass die Zellen trotz Expression des protektiven adenoviralen Proteins starben. Diesen Effekt konnten sie mit einer C-terminalen Deletionsmutante von Optineurin, welche nicht mehr mit 14.7K interagieren kann, nicht erzielen und führten den revertierten anti-apoptotischen Effekt auf die Interaktion der beiden Proteine zurück (Li et al. 1997). Die Apoptose-Induktion durch die Verwendung der cytoplasmatischen TNFR1-Domäne liefert wichtige Hinweise zum Mechanismus der 14.7K-vermittelten Apoptose-Hemmung: eine Blockade der Rezeptor-Internalisierung ist hier nicht möglich. Dies bedeutet, dass es neben der Internalisierungsblockade noch andere Mechanismen zur Inhibition der Apoptose geben muss, die zum Beispiel mit der Hemmung der Caspase-8 zusammenhängen könnten (siehe 4.2).

Allerdings ist fraglich, welche Art Proteinkomplex an der isolierten Rezeptordomäne gebildet wird und ob dieser die gleichen Prozesse in Gang setzt, wie ein durch externes TNF stimulierter TNFR1. Allgemein ist bei sämtlichen oben beschriebenen Experimenten anzumerken, dass die angesprochenen Proteine stets überexprimiert wurden und nicht in physiologischen Mengen in den Zellen vorkamen. Außerdem ist zu beachten, dass in den Zellen endogenes Optineurin vorhanden war und somit immer ein Mischeffekt beobachtet wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurden H1299-Zellen (humane Lungenkarzinom-Zellen), und KB-Zellen (HeLa-abgeleitete Zelllinie) verwendet, um die Interaktion von 14.7K und Optineurin funktionell im

Kontext der TNF-induzierten Apoptose zu charakterisieren, da sie zuvor in diesem Zusammenhang bereits erfolgreich als Modell eingesetzt wurden. Beide Zelllinien reagieren nach CHX-Behandlung TNF-sensitiv und sind durch die Expression von 14.7K gegenüber TNFR1-vermittelter Apoptose geschützt (Schneider-Brachert et al. 2006). Zudem ist in diesen Zellen der Mechanismus der Apoptose-Inhibition durch 14.7K bislang am besten charakterisiert.

Im Gegensatz zu vielen in der Literatur beschriebenen Experimenten, in denen Optineurin stets überexprimiert wurde, wurde in dieser Arbeit die zelluläre Expression von Optineurin durch siRNA unterdrückt. Ziel dabei war es herauszufinden, ob Optineurin zum einen selbst für die Induktion oder Inhibition der TNF-induzierten Apoptose wichtig ist (also pro-apoptotisch wirkt), oder ob zum anderen die Interaktion einen Einfluss auf den 14.7K vermittelten anti-apoptotischen Effekt hat. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die beiden möglichen Konsequenzen der Optineurin-Suppression auf die TNF-vermittelte Apoptose in Abhängigkeit der fraglichen Optineurin-Funktion.

Tabelle 4.2 Erwartete Auswirkung einer möglichen pro- bzw. anti-apoptotischen Optineurin-Funktion auf 14.7K wt- bzw. 14.7K PM- exprimierende Zellen

Optineurin-Funktion	parentale und 14.7K PM-exprimierende Zellen	14.7K-exprimierende Zellen
pro-apoptotisch	Suppression schwächt TNF-Effekt ab, fördert Überleben der Zellen	14.7K hemmt Optineurin, Suppression hat keinen Effekt auf die TNF-Resistenz
anti-apoptotisch	Suppression verstärkt TNF-Effekt	14.7K nutzt diese Optineurin-Funktion, Suppression schwächt die TNF-Resistenz

Die Abbildung 3.16 zeigt den Effekt der Optineurin-Suppression auf die TNF-induzierte Apoptose in protektierten (14.7K wt, mut 0, mut 20) und nicht protektierten (parentale, 14.7K PM) Zellen. Die Suppression des zellulären Optineurin in parentalen und 14.7K PM-exprimierenden Zellen hatte keinen Einfluss auf den zytotoxischen Effekt der TNF-Stimulation. Ebenso wenig wurde die TNF-Resistenz von 14.7K oder der 14.7K-Varianten negativ beeinflusst. Betrachtet man nur den Aspekt, dass der Schutz vor TNF-induzierter Apoptose von 14.7K von Optineurin unabhängig ist, könnte man Optineurin als pro-apoptotisches Protein ansehen, welches durch 14.7K gehemmt wird. Die Ergebnisse zur Apoptose-Induktion während der Überexpression von Optineurin in RGC- und HEK293-Zellen von Chalasani et al. und Li et al. würden gut in dieses Modell passen (Li, Kang, et al. 1998; Chalasani et al. 2007). Allerdings sollte dann auch eine Abschwächung des TNF-Effektes in parentalen oder 14.7K PM-exprimierenden Zellen zu sehen sein, der aber nicht beobachtet werden konnte. Demnach müsste man folgern, dass es in diesen Zellen keinen Effekt von Optineurin auf die TNF-induzierte Apoptose gibt. Es muss also einen anderen Grund für die Interaktion der beiden Proteine geben. Da die Interaktion in diesem Zusammenhang anscheinend keinen entscheidenden Funktionsgewinn für 14.7K darstellt, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass Optineurin durch 14.7K womöglich an einer bestimmten Funktion gehindert wird. Da 14.7K im C-terminalen Bereich von Optineurin bindet, handelt es sich offensichtlich um

Funktionen, die über dessen C-Terminus vermittelt werden. Der Blick auf die in dieser Regionen bindenden Interaktionspartner könnte helfen, diese Funktionen einzugrenzen. Neben den unter 4.3.1 bereits erwähnten Bindungspartnern Myosin VI und Huntingtin, interagieren auch RIP1, CYLD und A20 in einer C-terminalen Region von Optineurin (Swarup and Nagabhushana 2010) (siehe auch 1.6.). Interessanterweise sind diese Proteine mit der TNFR1-Signaltransduktion assoziiert. Allerdings handelt es sich dabei nicht um den TNF-induzierten Apoptosesignalweg, sondern um den ebenfalls vom TNFR1 aktivierten NF κ B-Signalweg. RIP1 dient dabei der Aktivierung des NF κ B-Signals, während A20 und CYLD mit der späteren Terminierung des Signals assoziiert sind. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Optineurin TNF-abhängig an den TNFR1 rekrutiert wird (Zhu et al. 2007). Folgt man der Hypothese, dass 14.7K inhibierend auf Optineurin wirkt, so könnte durch 14.7K entweder die Rekrutierung von Optineurin an den TNFR1 blockiert werden, oder 14.7K selbst auf diese Weise an den TNFR1-Komplex binden, um dort direkt funktionelle Interaktionen z.B. mit RIP1 zu blockieren. Um die Frage zu klären, welche der beiden Möglichkeiten zutrifft, wurden aus H1299/14.7K wt und H1299/14.7K PM TNFR1-Proteinkomplexe (Rezeptosomen) isoliert und auf die Anwesenheit von Optineurin und 14.7K überprüft. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.19 dargestellt und wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

4.3.3 Rekrutierung von 14.7K und Optineurin an den TNFR1

Aus der Analyse der TNFR1-Rezeptosomen geht hervor, dass 14.7K wt TNF-abhängig an den TNFR1-Komplex rekrutiert wird (Abb. 3.19). Dieses Ergebnis ist auch hinsichtlich der Arbeiten von Schneider et al. interessant, in denen nach Untersuchung von Rezeptosomen aus murinen Fibroblasten (NIH 3T3 und C127) 14.7K als Komponente des TNFR1-Komplexes ausgeschlossen wurde (Schneider-Brachert et al. 2006). Damals konnte gezeigt werden, dass die Assemblierung des DISC am TNFR1 sowohl in NIH 3T3-Zellen, wie auch in den in dieser Arbeit verwendeten H1299-Zellen, durch 14.7K blockiert werden konnte. Daher ging man vom gleichen Mechanismus in beiden Zelllinien aus. Die Anwesenheit von 14.7K wurde aber nur in Rezeptosomen aus NIH 3T3-Zellen überprüft.

In dieser Arbeit konnte nun erstmals eine Beteiligung von 14.7K am TNFR1-Komplex nachgewiesen werden. Unter dem Blickwinkel der 14.7K-vermittelten Apoptose-Hemmung durch die Blockade der DISC-Rekrutierung könnte vermutet werden, dass 14.7K zelltypabhängig direkt an die cytoplasmatische Domäne des TNFR1 bindet und damit die Assemblierung der Adapterproteine TRADD, FADD und Caspase-8 verhindert. Da der Rezeptor aber nie als möglicher Interaktionspartner von 14.7K identifiziert wurde (Horwitz 2001), sondern stattdessen zwei bestätigte Interaktionspartner von 14.7K, nämlich Optineurin und NEMO, im TNFR1-Proteinkomplex zu finden sind, ist diese These unwahrscheinlich. 14.7K wird also höchstwahrscheinlich über indirekte Wechselwirkungen an den TNFR1-Signalkomplex rekrutiert.

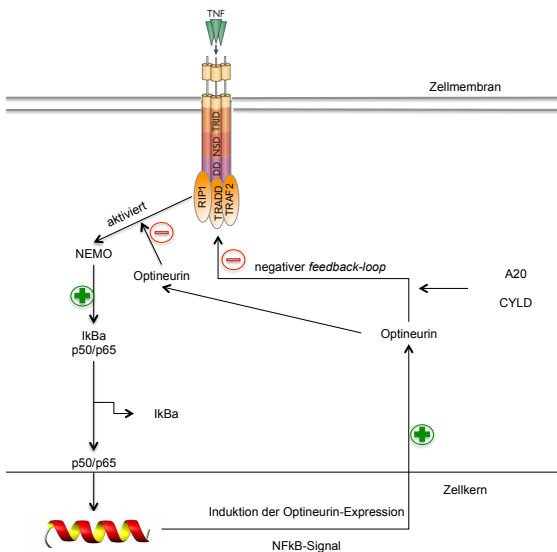
Eine derartige Interaktion würde auch erklären, weshalb 14.7K nach Transfektion der cytoplasmatischen TNFR1-Domäne in der Lage ist, den Zelltod in HEK293-Zellen zu verhindern (siehe 4.3.2). Durch entsprechende Versuche zur Proteininteraktion könnte dies genauer untersucht werden. Sinnvoll wäre dabei auch der Einsatz Optineurin- oder NEMO-defizienter Zellen, in denen nach Isolation von TNFR1-Rezeptosomen geprüft werden könnte, ob die Rekrutierung von 14.7K an den TNFR1-Komplex von der Interaktion mit einem dieser Bindungspartner zusammenhängt. Optineurin und NEMO sind beide, wenn auch auf gegensätzliche Weise, über die Interaktion mit RIP1 in die Regulation der NF κ B-Aktivierung involviert. NEMO dient dabei der Aktivierung des NF κ B-Signals, Optineurin wird eine Rolle bei der Terminierung des Signals zugeschrieben.

4.3.4 Hemmung von Optineurin als negativen Regulator des NF κ B-Signals durch 14.7K

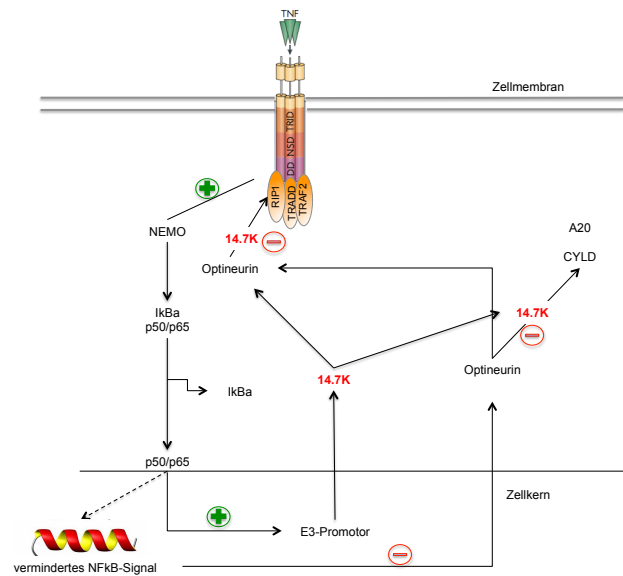
Im Hinblick auf die regulatorischen Eigenschaften Optineurins bezüglich der Terminierung des NF κ B-Signals (siehe 1.6) und der Fähigkeit von 14.7K, durch Bindung an p50 gleichzeitig die NF κ B-Antwort zu hemmen und die Aktivierung des eigenen Promotors zu fördern (siehe 1.5), scheint die Interaktion der Proteine darauf abzuzielen, eine Gegenregulation der NF κ B-Aktivierung durch Optineurin zu verhindern (siehe Abb. 4.4)

Dieses Modell wird zum einen dadurch gestützt, dass die Suppression der Optineurin-Expression durch siRNA keinen Einfluss auf den Schutz durch 14.7K gegenüber TNF-induzierter Apoptose hatte. Weiterhin ist aus der Analyse der NF κ B-Aktivierung ersichtlich, dass Optineurin in Anwesenheit von 14.7K in seiner Expression nicht so stark durch TNF induziert werden kann wie in 14.7K PM-exprimierenden Zellen. Dies zeigt, dass die postulierte Inhibierung der NF κ B-Antwort durch 14.7K auch in H1299-Zellen bzw. in KB-Zellen funktioniert (Abb. 3.20). Nicht zuletzt geben die Bindestellen von 14.7K, A20 und CYLD einen Hinweis auf die Möglichkeit eines derartigen Modells. Die Bindungsstelle von 14.7K an Optineurin konnte auf dessen C-Terminus festgelegt werden, an dem ebenfalls die Ubiquitin-modulierenden Proteine A20 und CYLD mit Optineurin interagieren. Es ist daher denkbar, dass 14.7K mit diesen Proteinen um die Bindestelle konkurriert und sie von dieser verdrängt. Optineurin könnte dann zwar selbst noch nach TNF-Stimulierung an den TNFR1 rekrutiert werden, würde diesmal aber nicht als Adapter für A20 und CYLD dienen, sondern stattdessen 14.7K an den TNFR1-Komplex transportieren. Die Rezeptosomen aus H1299/14.7K wt (Abb. 3.19) zeigen genau diesen Zustand. Da 14.7K PM nicht mehr an Optineurin binden kann, sollte diese Mutante auch nicht an den TNFR1-Komplex rekrutiert werden. Dies ist zwar der Fall, kann aber aufgrund der geringen Expressionsstärke des Proteins nicht eindeutig belegt werden.

A) In Abwesenheit von 14.7K



B) In Anwesenheit von 14.7K

**Abb. 4.4 Mögliche Regulation des NFκB-Signalweges durch Optineurin**

A) Die TNF-induzierte Aktivierung von NFκB sorgt für eine vermehrte Expression von Optineurin und bildet damit einen negativen *feedback-loop* zur Terminierung des Signals. Optineurin bindet an ubiquitiniertes RIP1 und verdrängt damit NEMO aus der Interaktion mit RIP1. Über die Interaktion mit A20 und CYLD wird RIP1 für den proteasomalen Abbau markiert und das Signal auf diese Weise beendet.

B) In Anwesenheit von 14.7K wird die Bindung des NFκB-Dimers an seine ursprüngliche Zielsequenz gehemmt, was zu einem verminderten NFκB-Signal und geringerer TNF-induzierter Optineurin-Expression führt. Folglich steht damit weniger Optineurin zur Verdrängung von NEMO an RIP1 zur Verfügung. Ebenso kann weniger Optineurin mit A20 und CYLD interagieren. Außerdem ist möglicherweise die Interaktion von Optineurin zu seinen zellulären Bindungspartnern durch die Bindung mit 14.7K gestört. Im Kontext einer Virusinfektion wird die Expression von Proteinen der E3-Region, darunter 14.7K, gefördert.

In Abwesenheit von 14.7K sollte in der Analyse isolierter TNFR1-Proteinkomplexe in parentalen Zellen neben Optineurin auch A20 und CYLD nachweisbar sein. Weiterhin wäre es sinnvoll, die exakte Bindungsstelle von 14.7K an Optineurin zu bestimmen, um einerseits das beschriebene Modell zu bestätigen und andererseits vielleicht Informationen darüber zu erhalten, ob 14.7K z. B. im Bereich der C-terminalen Ubiquitin-Binde-Domäne (UBD) von Optineurin bindet, die eine wichtige Rolle bei der Interaktion zu ubiquitiniertem RIP1 spielt. Sollte die 14.7K-Bindung diese Interaktion verhindern, könnte dies eine verstärkte Bindung von NEMO an RIP1 bedeuten, das nun nicht mehr mit Optineurin um diese Interaktion konkurrieren müsste. Die Folge davon wäre eine längerfristige Aktivierung des NFκB-Signals. Dagegen spricht allerdings, dass der NFκB-Inhibitor IκBα sowohl in 14.7K wt- als auch in 14.7K PM-exprimierenden Zellen mit der gleichen Kinetik nachproduziert wurde und damit nicht von einer längeren Aktivierung des NFκB-Signals gesprochen werden kann (Abb. 3.20). Höchstwahrscheinlich war aber der Beobachtungszeitraum

mit 60 Min. zu kurz gewählt, um den Effekt erkennbar zu machen. Daher sollte die NF κ B-Aktivierung in diesen Zelllinien erneut, diesmal aber über einen längeren Zeitraum, analysiert werden. Sollte die Hypothese richtig sein, so müsste die Degradierung von I κ B α in 14.7K PM-exprimierenden oder parental Zellen durch die Optineurin-abhängige Gegenregulation nach einer gewissen Zeit zum Erliegen kommen, während dies in Anwesenheit von 14.7K nicht der Fall sein sollte. Gleichzeitig könnte dabei die Ubiquitinierung von NEMO und RIP1 überprüft werden. Letztendlich sollte die Wahl der verwendeten Zellen überdacht werden. Besonders bei der Untersuchung komplex regulierter Signalwege können Dysfunktionen, veränderte oder gar ausgeschaltete Signalweiterleitungen im Zellzyklus, wie es bei Tumorzelllinien oft der Fall ist, zu unstimmigen oder artifiziellen Ergebnissen führen. Auch sollte darauf geachtet werden, für die untersuchte Funktionen einen Zelltyp zu wählen, der den ursprünglichen physiologischen Zellhintergrund möglichst gut widerspiegelt. Ideal wäre, in diesem Kontext primäre Makrophagen einer transgenen 14.7K-exprimierenden Maus zur Verfügung zu haben, da Makrophagen auch im Organismus diejenigen Zellen sind, die TNF produzieren. Außerdem kann die NF κ B-Antwort in Makrophagen durch 14.7K manipuliert werden (Carmody et al. 2006).

4.3.5 Zusammenfassung Optineurin-abhängiger und –unabhängiger Funktionen von 14.7K

Über den TNFR1 wird nach TNF-Stimulation sowohl die Apoptose induziert, wie auch der NF κ B-Signalweg aktiviert. 14.7K kann in beide Signalvermittlungen modulierend eingreifen. Die anti-apoptotische Funktion, also die Blockade der TNFR1-Internalisierung und des Apoptose-Programms, scheint Optineurin-unabhängig zu sein. Dies belegen die Ergebnisse aus TNFR1-Internalisierungsassay und Zytotoxizitätsassay (siehe 3.4), die mit den siRNA-Optineurin behandelten Zellen erzielt wurden.

Das Eingreifen in den NF κ B-Signalweg zur verbesserten Aktivierung des Virus-eigenen E3-Promotors bei gleichzeitiger Hemmung der zellulären antiviralen Immunantwort, ist vermutlich von der Interaktion mit Optineurin abhängig. 14.7K könnte durch Optineurin an den TNFR1-Proteinkomplex transportiert werden (Abb.3.19), um dort die negativ regulatorische Funktion von Optineurin zu inhibieren, welches sonst für die Terminierung des NF κ B-Signals sorgen würde.

4.4 Die Verbindung von E3-Promotor und den MAPK-Signalwegen

Wie in der Einleitung bereits dargestellt (1.2.3), führt die Aktivierung der MAPK p38, JNK und Erk 1/2 zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, die unter anderem zur Produktion inflammatorischer Zytokine führen. Zu den aktivierten Transkriptionsfaktoren gehören auch Mitglieder der c-Jun-, c-Fos- und ATF-Familie, die als Dimere das Aktivatorprotein AP-1 bilden (Brenner et al. 1989). MAP-Kinasen können über verschiedene Stimuli aktiviert werden, darunter auch Zytokine wie TNF, IL-1 oder IL-6 und es konnte gezeigt werden, dass durch TNF-Stimulation über RIP1 und TRAF2 die Aktivierung von JNK und p38 ausgelöst wird (Liu, Kim, et al. 1996). Die Überschneidung mit Mechanismen der NF κ B-Aktivierung werden dabei deutlich, da NF κ B ebenfalls über RIP1/TRAF2 assoziierte Prozesse aktiviert wird.

Interessanterweise kann der Promotor der E3-Region nicht nur durch NF κ B aktiviert werden, sondern enthält auch eine AP-1-Bindestelle. Die Mutation dieser Region führte zu einer Reduktion der Promotoraktivität (Deryckere and Burgert 1996). Es könnte daher ein Modell entwickelt werden, in dem analog zur NF κ B-Aktivierung die Initialisierung der MAPK zwar nicht beeinträchtigt ist, AP-1 aber ähnlich wie NF κ B an der Bindung seiner ursprünglichen zellulären Zielsequenz gehindert wird, um stattdessen die Expression der E3-Proteine über den E3-Promotor zu fördern. Dieses Modell wird dadurch gestützt, dass zum einen die Zytokin-Produktion in virusinfizierten Zellen reduziert war (Carmody et al. 2006), ein Effekt der möglicherweise nicht nur auf der Modulation der NF κ B-Antwort durch 14.7K basiert, und zum anderen keine Beeinträchtigung der Aktivierung der MAPK in H1299/14.7K wt oder KB/14.7K wt detektiert werden konnte (Abb. 3.20). Es bleibt experimentell zu überprüfen, ob 14.7K mit AP-1 in ähnlicher Weise interagieren kann, wie mit der p50-Komponente des NF κ B-Dimers, oder ob ein anderes virales Protein dafür verantwortlich ist.

4.5 Zusammenspiel von 14.7K mit zellulären Proteinen

Insgesamt betrachtet ist 14.7K ein äußerst bemerkenswertes Protein, das in sämtliche TNFR1-induzierten Signalwege modulierend eingreift, um virusinfizierte Zellen vor der Immunantwort des Wirtes zu schützen, sowie zelluläre Signale zum eigenen Vorteil zu beeinflussen, um die Persistenz der Virusinfektion zu ermöglichen. Das folgende Schema stellt die vielfältigen Rollen von 14.7K im Netzwerk seiner zellulären Interaktionspartner und Signalwege dar.

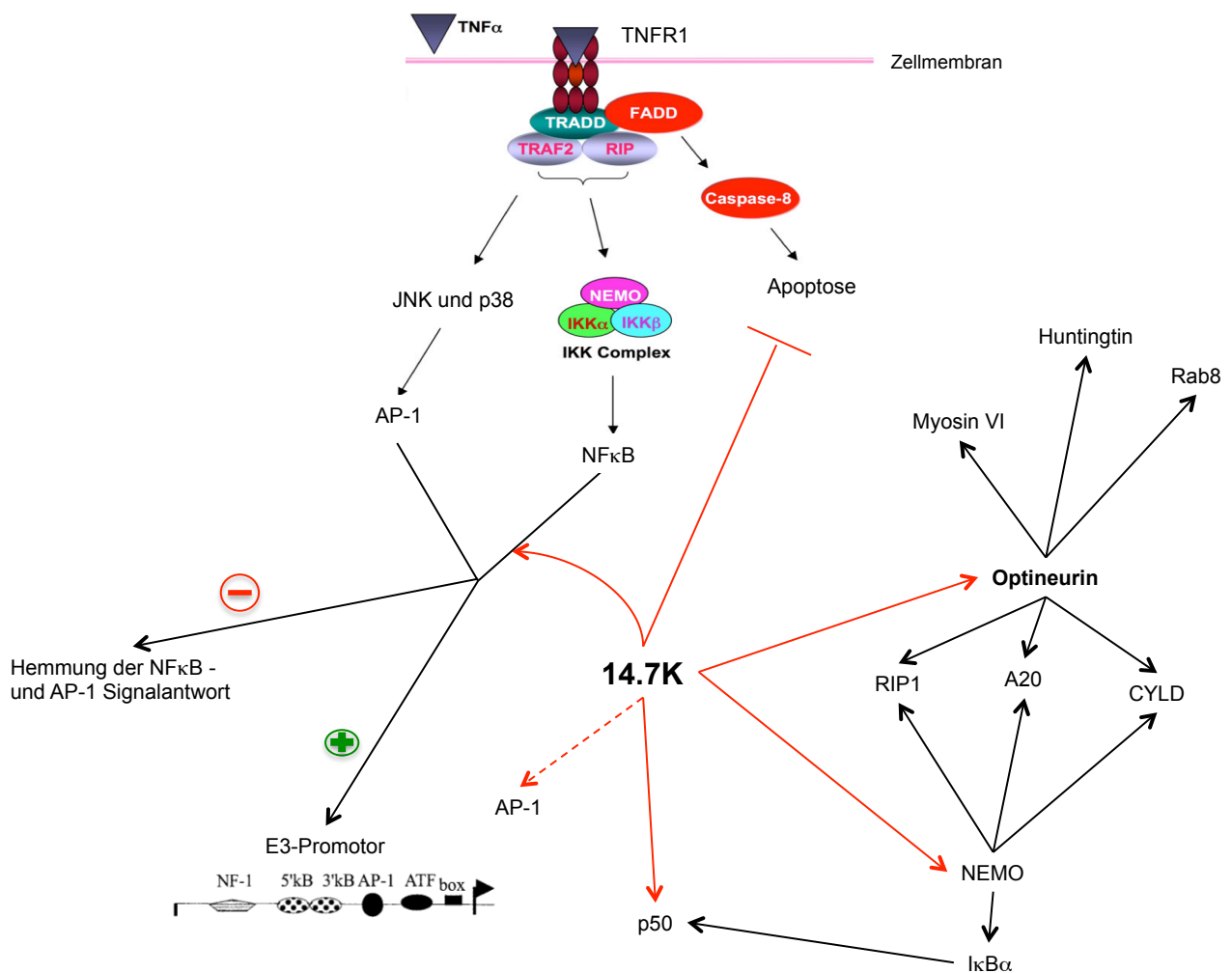


Abb. 4.5 Das adenovirale Protein 14.7K und seine zellulären Interaktionspartner

Das Schema zeigt das adenovirale Protein 14.7K im Zusammenspiel mit zellulären Proteinen und den zugehörigen TNFR1-assoziierten Netzwerken. Durch Interaktion mit Optineurin wird das NF κ B-Signaling so beeinflusst, dass dadurch die Aktivierung des 14.7K-Promotors (E3-Promotor) gefördert wird, spezifische NF κ B-aktivierte Signale aber verhindert werden.

4.6 Ausblick

Betrachtet man die zahlreichen zellulären Interaktionspartner und beeinflussten Signalwege, so stellt sich die Frage nach einem Konzept, das diese Funktionsvielfalt von 14.7K erklären kann. Die genaue Charakterisierung der Tertiärstruktur könnte wichtige Hinweise darauf geben, auf welche Weise 14.7K mit den unterschiedlichen Proteinen interagiert. In diesem Kontext wäre es äußerst interessant herauszufinden, ob 14.7K als oligomerer Komplex oder als Einzelprotein agiert und ob dies die Selektivität der Interaktion beeinflusst. Da das Protein vergleichsweise klein ist, könnte eine Oligomerisierung die Bildung oder den Zugewinn von möglichen Bindungsstellen und Funktionen bedeuten. Die Abhängigkeit vom Muster posttranslationaler Modifikationen der entsprechenden Bindungspartner, wie z.B. Phosphorylierung bei Optineurin oder NEMO, sollte dabei mit einbezogen werden.

14.7K greift in zwei Hauptsignalwege des TNFR1 inhibierend, regulierend und modulierend ein. Die in 4.3.6 vorgestellte Sichtweise, nach der 14.7K als Inhibitor der negativ-regulatorischen Funktion von Optineurin in der NF κ B-Aktivierung aufzufassen ist, könnte die biologische Bedeutung der Interaktion von 14.7K und Optineurin begründen und den Einfluss auf NF κ B-abhängige Signalwege erklären. Da Optineurin und NEMO C-terminale Homologie aufweisen, ist es nicht erstaunlich, dass beide als Interaktionspartner von 14.7K identifiziert wurden. Ihre Funktion bezüglich der NF κ B-Aktivierung ist aber gänzlich gegensätzlich, so dass nicht davon ausgegangen werden kann, dass 14.7K beide Proteine auf gleiche Weise beeinflusst. Die Charakterisierung der NEMO-14.7K-Interaktion könnte daher wertvolle Informationen über Flexibilität, Diversität und Spezifität 14.7K-vermittelter Modulationen liefern.

Die Blockade der TNF-induzierten Apoptose durch 14.7K ist offenbar nicht an die Interaktion mit Optineurin gekoppelt. In diesem Zusammenhang fehlt bislang noch immer ein Hinweis auf die mechanistische Grundlage, die der Rekrutierungsblockade der Adapterproteine TRADD, FADD und Caspase-8 an den aktivierten TNFR1 zugrunde liegt. Die erneute Suche nach Interaktionspartnern, welche mit apoptotischen Prozessen assoziiert sind, könnte dafür ein Lösungsansatz sein. Dazu könnten 14.7K-assoziierte Proteinkomplexe z.B. durch Immunpräzipitation oder GST-*pull-down*-Ansätze isoliert werden und ihre einzelnen Komponenten massenspektrometrisch identifiziert werden. Insgesamt dürfte sich durch die Charakterisierung des 14.7K-Proteins und seiner Funktionen ein tieferes Verständnis für die Wirkungsweise viraler Proteine im Zusammenspiel mit dem Netzwerk zellulärer Proteine ergeben und die Signaltransduktion über den TNFR1 besser verstanden werden.

14.7K scheint für TNFR1-assoziierte Signale eine Art „spezifischer Generalschlüssel“ zu sein, welcher die Apoptose-Tür verschließt, jedoch gleichzeitig den NF κ B-Ausgang offenhält, das Signal aber ins eigene Haus umleitet.

5. Anhang

5.1 Abkürzungen

Soweit nicht anders verzeichnet, folgen die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen den Empfehlungen des Duden, dem Gold Book der IUPAC (insbesondere physikalische Größen und Einheiten) und dem White Book der JCBN (insbesondere Abkürzungen der Nukleotide und Aminosäuren).

Ad	Adenovirus	EDAR	<i>ectodysplasin receptor</i>
AFT2	activating transcription factor 2	EDTA	Ethylendiamin-N-N,N',N'-tetraacetat
AIF	apoptosis inducing factor	EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
AK	Antikörper	E3	<i>early region 3</i>
Ac-		EGTA	Ethylenglycol-bis-(β -aminoethylether-N-N,N',N'-tetraacetat
AMC-IETD	Acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp7-amido-4-methyl-coumarin	Erk	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
AP-1	<i>apoptotic protease activating factor 1</i>	FADD	<i>fas associated death domain protein</i>
A-SMase	<i>acid sphingomyelinase</i>	FCS	<i>Fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
ATTC	<i>American Type Culture Collection</i>	FITC	Fluorescein-isothiocyanat
bad	<i>Bcl-2 antagonist of cell death</i>	FIP	<i>14.7K interacting protein</i>
bax	<i>Bcl-2 asociated x protein</i>	GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>	Grb2	<i>growth factor receptor bound protein</i>
BH	<i>Bcl-2 homology</i>	gp	<i>glycosylated protein</i>
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>	GST	Glutathion-S-Transferase
bp	<i>basepair</i>	HA	Human influenza hemagglutinin
BSA	bovines serumalbumin	HAP-1	<i>Huntingin associated protein 1</i>
CAD	<i>caspase activated DNase</i>	HEK	<i>human embryonic kidney</i>
Caspase	<i>cysteine-aspartate specific protease</i>	HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
CHX	Cycloheximid	HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
CIP	<i>Calf intestine alkaline phosphatase</i>	IFN	Interferon
c-Jun	<i>protein of Jun gene, transcription factor</i>	Ig	Immunglobulin
c-fos	<i>protein of FOS gene, transcription factor</i>	I κ B	<i>inhibitor of nuclear factor κB</i>
CMV	Cytomegalie-Virus	IKK	I κ B kinase
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>	IL	Interleukin
DD	<i>death domain</i>	IPTG	Isopropylthiogalactosid
DED	<i>death effector domain</i>	IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
DISC	<i>death inducin signaling complex</i>	JCBN	<i>Joint Commission on Biochemical Nomenclature</i>
DMEM	<i>DULBECCO'S minimal essential medium</i>	JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	Kan	Kanamycin
DNA	<i>desoxyribonucleotid acid</i>		
DR	<i>death receptor</i>		
DTT	<i>Dithiothreitol</i>		
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>		

L	<i>late</i>	RT	Raumtemperatur
MAPK	<i>mitogen activated kinase</i>	SDS	Natriumdodecylsulfat
MHC	major histocompatibility complex	T4-PNK	Polynucleotid-Kinase aus dem Bakteriophagen T4
Min.	Minuten	TACE	<i>TNF alpha converting enzyme</i>
MVB	<i>multivesicular bodies</i>	TBE	Tris-Borat-EDTA
mRNA	<i>messenger RNA</i>	TBS	<i>Tris buffered saline</i>
NEMO	<i>NFκB essential modulator</i>	TBST	TBS-Tween
NFκB	nuclear factor κB	TfR	Transferrin-Rezeptor
NGFR	<i>nerve growth factor receptor</i>	TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
Ni-NTA	<i>Nickel-nitrilotriacetic acid</i>	TNFR1	<i>TNF receptor 1</i>
ODx	Optische Dichte bei x nm	TNFR2	<i>TNF receptor 2</i>
PAGE	Polyacrylamid-Elektrophorese	TRADD	<i>TNF receptor associated death domain protein</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>	TRAF2	<i>TNF receptor associated protein</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>	TRAIL	<i>TNF related apoptosis inducing ligand</i>
PLAD	<i>preligand assembly domain</i>	TRID	<i>TNF receptor internalization domain</i>
PM	Punktmutante	ÜN	Über Nacht
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	ÜS	Überstand
PTP	<i>permeability transition pore</i>	VDAC	<i>voltage dependent anion channel</i>
Rab	<i>ras associated in brain</i>	wt	wildtypisch
Ras	<i>rat sarcoma</i>	zVAD	carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O- methyl]- fluoromethylketone
RID	<i>receptor internalization and degradation</i>		
RIP1	<i>receptor interacting protein</i>		
RNA	<i>ribonucleotide acid</i>		
RGC	<i>retinal ganglion cell</i>		
RPE	<i>retinal pigment epithelium</i>		
ROS	reactive oxygen species		

5.2 DNA-Konstrukte

5.2.1 Oligonukleotide

Oligonukleotide für Klonierungen.

Tabelle 5.1 Primer

Name	Sequenz	Schnittstelle
14.7K BamHI (for)	5'-cccggatccatgactgaatctctagatctag-3'	BamH I
14.7K EcoRI (for)	5'-gcccggaattcggatgactgaatctctagatc-3'	EcoRI
14.7K EcoRI (rev)	5'-ccgcgaattctcgttgaatggaataagatcttaatacc-3'	EcoRI
14.7K XhoI (rev)	5'-gggctcgagtttagttgaatggaataagatctc-3'	EcoRI
Optn EcoRI aa 395 (for)	5'-gaattcatgaagcttctgcaagaacataataatg-3'	EcoRI
Optn XhoI (rev)	5' gccctcgagttaaatgatgcaatccatcacg-3'	XhoI

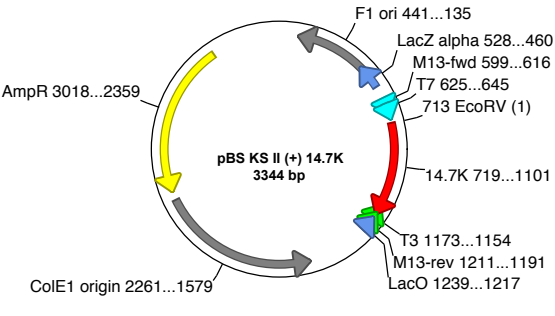
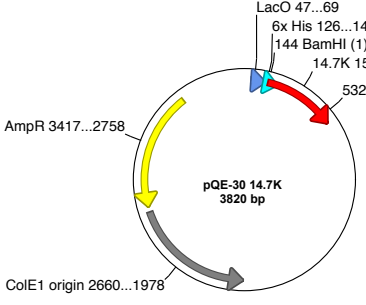
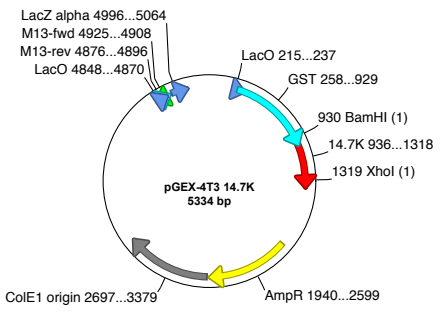
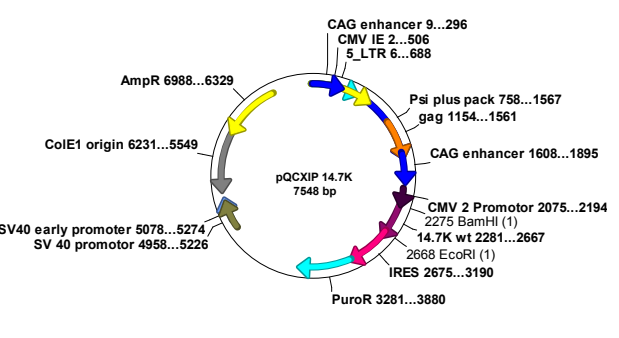
5.2.2 Sequenzen der siRNA-Optineurin

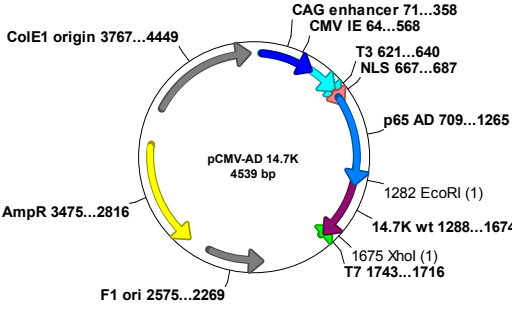
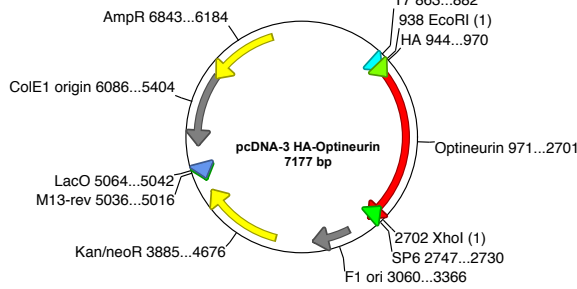
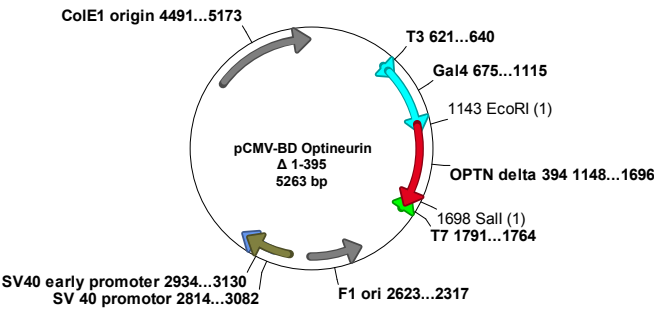
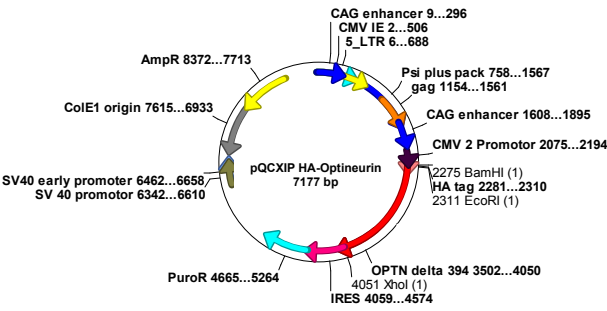
siRNA smart pool zur Suppression der zellulären Optineurin Expression.

Tabelle 5.2 Sequenzen der siRNA-Optineurin

Name	Sequenz
ON-TARGETplus SMARTpool siRNA J-016269-05	GGGCUCAGAUGGAAGUUUA
ON-TARGETplus SMARTpool siRNA J-016269-06	CCAUGAAGCUAAAUAUAUCA
ON-TARGETplus SMARTpool siRNA J-016269-07	CUUCGAACAUGAGGAGUUA
ON-TARGETplus SMARTpool siRNA J-016269-08	CUAAUGGCCUUGAGUCAUG

5.2.3 Plasmide

Beschreibung	Plasmid-Karte
<p>Name: pBS KS II (+) 14.7K</p> <p>Vektor: pBS KS (+); Kommerzieller Vektor von Stratagene, EcoRV verdaut</p> <p>Insert: 14.7K; PCR-Produkt, <i>blunt-ligation</i></p> <p>Prokaryotischer Klonierungssvektor (Phagemid) mit Ampicillin-Resistenz. Ausgangs-Plasmid zur Herstellung aller 14.7K Varianten, die während der Doktorarbeit von Alexander Lehn generiert wurden.</p>	
<p>Name: pQE-30 14.7K</p> <p>Vektor: pQE-30; Kommerzieller Vektor von Qiagen, BamHI- und Sall-verdaut</p> <p>Insert: 14.7K; PCR-Produkt, BamHI- und XhoI- verdaut, Template: pBS-KS II (+)-14.7K wt</p> <p>Prokaryotischer Expressionsvektor. Erlaubt Expression mit N-terminalem His-Tag (RGSHHHHHH) unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren lac-Promotors.</p>	
<p>Name: pGEX-4T3 14.7K</p> <p>Vektor: pGEX-4T3; Kommerzieller Vektor von GE Healthcare (ehem. Amersham), BamHI- und XhoI-verdaut</p> <p>Insert: 14.7K; PCR-Produkt, BamHI- und XhoI- verdaut, Template: pBS-KS II (+)-14.7K wt</p> <p>Prokaryotischer Expressionsvektor. Erlaubt Expression mit N-terminalem GST-Tag unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren lac-Promotors.</p>	
<p>Name: pQCXIP 14.7K</p> <p>Vektor: pQCXIP; Kommerzieller Vektor von Clontech Laboratories; BamHI- und EcoRI-verdaut</p> <p>Insert: 14.7K; PCR-Produkt, BamHI- und EcoRI-verdaut, Template: pBS-KS II (+)-14.7K wt</p> <p>Eukaryotischer Expressionsvektor. Erlaubt Expression unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Verpackungssignal erlaubt den Transfer der DNA durch Retroviren. Neomycin-Resistenz zur Selektion in Eukaryoten. Ampicillin-Resistenz zur Selektion in Prokaryoten.</p>	

<p>Name: pCMV-AD 14.7K</p> <p>Vektor: pCMV-AD; Kommerzieller Vektor von Stratagene; BamHI- und EcoRI-verdaut</p> <p>Insert: 14.7K; PCR-Produkt, EcoRI- und XhoI-verdaut, Template: pBS-KS II (+)-14.7K wt</p> <p>Eukaryotischer Expressionsvektor. Erlaubt Expression mit N-terminaler p65-Aktivierungsdomäne (p65 AD) unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Komponente des <i>Mammalian Two-Hybrid Assay Kit</i>.</p>	
<p>Name: pcDNA 3 HA-Optineurin</p> <p>Vektor: pcDNA 3.1; Kommerzieller Vektor von invitrogen; BamHI- und EcoRI-verdaut</p> <p>Insert: HA-Optineurin; Schnittstellen EcoRI und XhoI</p> <p>Eukaryotischer Expressionsvektor. Erlaubt Expression mit N-terminaler HA-tag (YPYDVDPYA) unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Erhalten von Dr. S. Ferguson (Robarts Research Institute, London).</p>	
<p>Name: pCMV-BD Optineurin Δ1-394</p> <p>Vektor: pCMV-BD; Kommerzieller Vektor von Stratagene; EcoRI- und Sall-verdaut</p> <p>Insert: OptineurinΔ1-394; PCR-Produkt, EcoRI- und XhoI-verdaut</p> <p>Eukaryotischer Expressionsvektor. Erlaubt Expression mit N-terminaler GAL4-DNA-Bindedomäne (GAL4 BD) unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Komponente des <i>Mammalian Two-Hybrid Assay Kit</i>.</p>	
<p>Name: pQCXIP HA-Optineurin Δ1-394</p> <p>Vektor: pQCXIP; Kommerzieller Vektor von Clontech Laboratories; EcoRI- und XhoI-verdaut</p> <p>Insert: Optineurin Δ1-394; PCR-Produkt, EcoRI- und XhoI-verdaut</p> <p>Eukaryotischer Expressionsvektor. Erlaubt Expression unter der Kontrolle eines CMV-Promotors als Fusionsprotein mit N-terminalem HA-tag (YPYDVDPYA).</p>	

Literaturverzeichnis

- Aggarwal, B. B., W. J. Kohr, P. E. Hass, B. Moffat, S. A. Spencer, W. J. Henzel, T. S. Bringman, G. E. Nedwin, D. V. Goeddel, and R. N. Harkins. 1985. "Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization." *Journal of Biological Chemistry* 260 (4): 2345.
- Aggarwal, Bharat B. 2003. "Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword." *Nature Reviews. Immunology* 3 (9) (September): 745-756. doi:10.1038/nri1184.
- Ang, Agnes Lee, Heike Fölsch, Ulla-Maija Koivisto, Marc Pypaert, and Ira Mellman. 2003. "The Rab8 GTPase selectively regulates AP-1B-dependent basolateral transport in polarized Madin-Darby canine kidney cells." *The Journal of Cell Biology* 163 (2) (October 27): 339-350. doi:10.1083/jcb.200307046.
- Anglade, P., S. Vyas, F. Javoy-Agid, M. T. Herrero, P. P. Michel, J. Marquez, A. Mouatt-Prigent, M. Ruberg, E. C. Hirsch, and Y. Agid. 1997. "Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease." *Histology and Histopathology* 12 (1) (January): 25-31.
- Ashkenazi, A., and V. M. Dixit. 1998. "Death receptors: signaling and modulation." *Science* 281 (5381): 1305.
- Baud, V., Z. G. Liu, B. Bennett, N. Suzuki, Y. Xia, and M. Karin. 1999. "Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain." *Genes & development* 13 (10): 1297.
- Benedict, C. A., P. S. Norris, T. I. Prigozy, J. L. Bodmer, J. A. Mahr, C. T. Garnett, F. Martinon, J. Tschopp, L. R. Gooding, and C. F. Ware. 2001. "Three adenovirus E3 proteins cooperate to evade apoptosis by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor-1 and -2." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (5) (February 2): 3270-3278. doi:10.1074/jbc.M008218200.
- Benedict, C. A., and C. F. Ware. 2001. "Virus targeting of the tumor necrosis factor superfamily." *Virology* 289 (1) (October 10): 1-5. doi:10.1006/viro.2001.1109.
- Benedict, Chris A., Theresa A. Banks, and Carl F. Ware. 2003. "Death and survival: viral regulation of TNF signaling pathways." *Current Opinion in Immunology* 15 (1) (February): 59-65.
- Benedict, Chris A., Paula S. Norris, and Carl F. Ware. 2002. "To kill or be killed: viral evasion of apoptosis." *Nature Immunology* 3 (11): 1013-1018. doi:10.1038/ni1102-1013.
- Bernstein, E., A. M. Denli, and G. J. Hannon. 2001. "The rest is silence." *Rna* 7 (11): 1509.
- Bertin, J., R. C. Armstrong, S. Otilie, D. A. Martin, Y. Wang, S. Banks, G. H. Wang, et al. 1997. "Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (4) (February 18): 1172-1176.
- Best, Sonja M. 2008. "Viral subversion of apoptotic enzymes: escape from death row." *Annual Review of Microbiology* 62: 171-192. doi:10.1146/annurev.micro.62.081307.163009.
- Beutler, B., and A. Cerami. 1986. "Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin." *Nature* 320 (6063) (April 17): 584-588. doi:10.1038/320584a0.
- Blam, M. E., R. B. Stein, and G. R. Lichtenstein. 2001. "Integrating anti-tumor necrosis factor therapy in inflammatory bowel disease: current and future perspectives." *The American Journal of Gastroenterology* 96 (7) (July): 1977-1997. doi:10.1111/j.1572-0241.2001.03931.x.
- Boldin, M. P., I. L. Mett, E. E. Varfolomeev, I. Chumakov, Y. Shemer-Avni, J. H. Camonis, and D. Wallach. 1995. "Self-association of the 'death domains' of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects." *The Journal of Biological Chemistry* 270 (1) (January 6): 387-391.
- Bond, Lisa M., Andrew A. Peden, John Kendrick-Jones, James R. Sellers, and Folma Buss. 2011. "Myosin VI and its binding partner optineurin are involved in secretory vesicle fusion at the plasma membrane." *Molecular Biology of the Cell* 22 (1) (January 1): 54-65. doi:10.1091/mbc.E10-06-0553.
- Bonifacino, Juan S., and Linton M. Traub. 2003. "Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes." *Annual Review of Biochemistry* 72: 395-447. doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161800.
- Boya, Patricia, Anne-Laure Pauleau, Delphine Poncet, Rosa-Ana Gonzalez-Polo, Naoufal Zamzami, and Guido Kroemer. 2004. "Viral proteins targeting mitochondria: controlling cell death." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1659 (2-3) (December 6): 178-189. doi:10.1016/j.bbabi.2004.08.007.
- Brenner, David A., Maureen O'Hara, Peter Angel, Mario Chojkier, and Michael Karin. 1989. "Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor- α ." *Nature* 337 (6208): 661-663. doi:10.1038/337661a0.
- Brenner, Dirk, and Tak W. Mak. 2009. "Mitochondrial cell death effectors." *Current Opinion in Cell Biology* 21 (6) (December): 871-877. doi:10.1016/j.ceb.2009.09.004.
- Burgert, H. G., and S. Kvist. 1985. "An adenovirus type 2 glycoprotein blocks cell surface expression of human histocompatibility class I antigens." *Cell* 41 (3) (July): 987-997.
- Burgert, H. G., J. L. Maryanski, and S. Kvist. 1987. "E3/19K" protein of adenovirus type 2 inhibits lysis of cytolytic T lymphocytes by blocking cell-surface expression of histocompatibility class I antigens." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (5) (March): 1356-1360.
- Burgert, H. G., Z. Ruzsics, S. Obermeier, A. Hilgendorf, M. Windheim, and A. Elsing. 2002. "Subversion of host defense mechanisms by adenoviruses." *Current Topics in Microbiology and Immunology* 269: 273-318.
- Burgert, H., and J. H. Blusch. 2000. "Immunomodulatory functions encoded by the E3 transcription unit of adenoviruses." *Virus genes* 21 (1): 13-25.
- Cande, C. 2002. "Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death?" *Journal of Cell Science* 115 (24): 4727-4734. doi:10.1242/jcs.00210.
- Carmody, Ruaidhrí J., Kimberly Maguschak, and Youhai H. Chen. 2006. "A novel mechanism of nuclear factor-kappaB regulation by adenoviral protein 14.7K." *Immunology* 117 (2) (February): 188-195. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02277.x.
- Carswell, E. A., L. J. Old, R. L. Kassel, S. Green, N. Fiore, and B. Williamson. 1975. "An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (9): 3666.
- Caviston, J. P., A. L. Zajac, M. Tokito, and E. L. F. Holzbaur. 2010. "Huntingtin coordinates the dynein-mediated dynamic positioning of endosomes and lysosomes." *Molecular Biology of the Cell* 22 (4): 478-492. doi:10.1091/mbc.E10-03-0233.
- Chalah, Anas, and Roya Khosravi-Far. 2008. "The mitochondrial death pathway." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 615: 25-45. doi:10.1007/978-1-4020-6554-5_3.
- Chalasani, Madhavi Latha, Dorairajan Balasubramanian, and Ghanshyam Swarup. 2008. "Focus on molecules: optineurin." *Experimental Eye Research* 87 (1) (July): 1-2. doi:10.1016/j.exer.2007.10.021.
- Chalasani, Madhavi Latha, Vegesna Radha, Vijay Gupta, Neeraj Agarwal, Dorairajan Balasubramanian, and Ghanshyam Swarup. 2007. "A glaucoma-associated mutant of optineurin selectively induces death of retinal ganglion cells which is inhibited by antioxidants." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48 (4) (April): 1607-1614. doi:10.1167/iovs.06-0834.
- Chalasani, Madhavi Latha, Ghanshyam Swarup, and Dorairajan Balasubramanian. 2009. "Optineurin and Its Mutants: Molecules Associated with Some Forms of Glaucoma." *Ophthalmic Research* 42 (4): 176-184. doi:10.1159/000232400.
- Chan, F. K., H. J. Chun, L. Zheng, R. M. Siegel, K. L. Bui, and M. J. Lenardo. 2000. "A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling." *Science (New York, N.Y.)* 288 (5475) (June 30): 2351-2354.
- Chang, L., and M. Karin. 2001. "Mammalian MAP kinase signalling cascades." *Nature* 410 (6824) (March 1): 37-40. doi:10.1038/35065000.
- Chen, G., and D. V. Goeddel. 2002a. "TNF-R1 signaling: a beautiful pathway." *Science's STKE* 296 (5573): 1634.
- Chen, Guoqing, and David V. Goeddel. 2002b. "TNF-R1 signaling: a beautiful pathway." *Science (New York, N.Y.)* 296 (5573) (May 31): 1634-1635. doi:10.1126/science.1071924.
- Chen, Lin-Feng, and Warner C. Greene. 2004. "Shaping the nuclear action of NF-kappaB." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 5 (5) (May): 392-401. doi:10.1038/nrm1368.
- Chen, Lin, Simon N. Willis, Andrew Wei, Brian J. Smith, Jamie I. Fletcher, Mark G. Hinds, Peter M. Colman, Catherine L. Day, Jerry M. Adams, and David C. S. Huang. 2005. "Differential targeting of pro-survival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function." *Molecular Cell* 17 (3) (February 4): 393-403. doi:10.1016/j.molcel.2004.12.030.
- Chen, P., J. Tian, I. Kovacs, and J. T. Bruder. 1998. "Interaction of the adenovirus 14.7-kDa protein with FLICE inhibits Fas ligand-induced apoptosis." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (10) (March 6): 5815-5820.
- Chen, Z. J., V. Bhoj, and R. B. Seth. 2006. "Ubiquitin, TAK1 and IKK: is there a connection?" *Cell Death and Differentiation* 13 (5) (May): 687-692. doi:10.1038/sj.cdd.4401869.
- Clarke, P. G., and S. Clarke. 1995. "Historic apoptosis." *Nature* 378 (6554) (November 16): 230. doi:10.1038/378230c0.
- . 1996. "Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena." *Anatomy and Embryology* 193 (2) (February): 81-99.
- Clayton, J. R., and J. M. Hardwick. 2008. *Encyclopedia of Virology*. Elsevier.
- Clem, R., M. Fechheimer, and L. Miller. 1991. "Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells." *Science* 254 (5036): 1388-1390. doi:10.1126/science.1962198.
- Coley, W. B. 1891. "II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma." *Annals of surgery* 14 (3): 199.
- Collins, R. J., B. V. Harmon, G. C. Gobé, and J. F. Kerr. 1992. "Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criterion for identifying apoptosis." *International Journal of Radiation Biology* 61 (4) (April): 451-453.
- Cory, Suzanne, and Jerry M. Adams. 2002. "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." *Nature Reviews. Cancer* 2 (9) (September): 647-656. doi:10.1038/nrc883.
- Daugas, E., D. Nochy, L. Ravagnan, M. Loeffler, S. A. Susin, N. Zamzami, and G. Kroemer. 2000. "Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis." *FEBS Letters* 476 (3) (July 7): 118-123.
- Davis, R. J. 1999. "Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase." *Biochemical Society Symposium* 64: 1-12.
- De Marco, Nadia, Mario Buono, Fulvia Troise, and Graciana Diez-Roux. 2006. "Optineurin increases cell survival and translocates to the nucleus in a Rab8-dependent manner upon an apoptotic stimulus." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (23) (June 9): 16147-16156. doi:10.1074/jbc.M601467200.

- Deryckere, F., and H. G Burgert. 1996. "Tumor necrosis factor α induces the adenovirus early 3 promoter by activation of NF- κ B." *Journal of Biological Chemistry* 271 (47): 30249.
- Devin, A, A Cook, Y Lin, Y Rodriguez, M Kelliher, and Z Liu. 2000. "The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation." *Immunity* 12 (4) (April): 419-429.
- Devin, Anne, Yong Lin, and Zheng-gang Liu. 2003. "The role of the death-domain kinase RIP in tumour-necrosis-factor-induced activation of mitogen-activated protein kinases." *EMBO Reports* 4 (6): 623-627. doi:10.1038/sj.embor.embor854.
- Ea, Chee-Kwee, Li Deng, Zong-Ping Xia, Gabriel Pineda, and Zhijian J Chen. 2006. "Activation of IKK by TNF α requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO." *Molecular Cell* 22 (2) (April 21): 245-257. doi:10.1016/j.molcel.2006.03.026.
- Earnshaw, W C, L M Martins, and S H Kaufmann. 1999. "Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis." *Annual Review of Biochemistry* 68: 383-424. doi:10.1146/annurev.biochem.68.1.383.
- Elising, A, and H G Burgert. 1998. "The adenovirus E3/10.4K-14.5K proteins down-modulate the apoptosis receptor Fas/Apo-1 by inducing its internalization." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (17) (August 18): 10072-10077.
- Enari, M, H Sakahira, H Yokoyama, K Okawa, A Iwamatsu, and S Nagata. 1998. "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD." *Nature* 391 (6662) (January 1): 43-50. doi:10.1038/34112.
- Ermolaeva, Maria A, Marie-Cécile Michallet, Nikoleta Papadopolou, Olaf Utermöhlen, Ksanthi Kranidioti, George Kollias, Jürg Tschopp, and Manolis Pasparakis. 2008. "Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory responses." *Nature Immunology* 9 (9) (September): 1037-1046. doi:10.1038/ni.1638.
- Fadeel, B, and S Orrenius. 2005. "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease." *Journal of Internal Medicine* 258 (6) (December): 479-517. doi:10.1111/j.1365-2796.2005.01570.x.
- Fulda, Simone, and Klaus-Michael Debatin. 2004. "Apoptosis signaling in tumor therapy." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1028 (December): 150-156. doi:10.1196/annals.1322.016.
- Galluzzi, Lorenzo, Catherine Brenner, Eugenia Morselli, Zahia Touat, and Guido Kroemer. 2008. "Viral Control of Mitochondrial Apoptosis." Ed. B. Brett Finlay. *PLoS Pathogens* 4 (5): e1000018. doi:10.1371/journal.ppat.1000018.
- Gerl, R., and D. L Vaux. 2005. "Apoptosis in the development and treatment of cancer." *Carcinogenesis* 26 (2): 263.
- Godbey, W T, K K Wu, and A G Mikos. 1999a. "Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle." *Journal of Biomedical Materials Research* 45 (3) (June 5): 268-275.
- . 1999b. "Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery." *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 60 (2-3) (August 5): 149-160.
- Gooding, L. 1988. "A 14,700 MW protein from the E3 region of adenovirus inhibits cytolysis by tumor necrosis factor." *Cell* 53 (3): 341-346. doi:10.1016/0092-8674(88)90154-7.
- Gooding, L R, I O Sofola, A E Tollefson, P Duerksen-Hughes, and W S Wold. 1990. "The adenovirus E3-14.7K protein is a general inhibitor of tumor necrosis factor-mediated cytolysis." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 145 (9) (November 1): 3080-3086.
- Grell, M, E Douni, H Wajant, M Löhden, M Clauss, B Maxeiner, S Georgopoulos, et al. 1995. "The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor." *Cell* 83 (5) (December 1): 793-802.
- Grell, M, H Wajant, G Zimmermann, and P Scheurich. 1998. "The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (2) (January 20): 570-575.
- Gross, A, J M McDonnell, and S J Korsmeyer. 1999. "BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis." *Genes & Development* 13 (15) (August 1): 1899-1911.
- Hanahan, D, and R A Weinberg. 2000. "The hallmarks of cancer." *Cell* 100 (1) (January 7): 57-70.
- Hattula, K, and J Peränen. 2000. "FIP-2, a coiled-coil protein, links Huntingtin to Rab8 and modulates cellular morphogenesis." *Current Biology: CB* 10 (24) (December 14): 1603-1606.
- Hayden, Matthew S., and Sankar Ghosh. 2008. "Shared Principles in NF- κ B Signaling." *Cell* 132 (3): 344-362. doi:10.1016/j.cell.2008.01.020.
- Hehlgans, Thomas, and Klaus Pfeffer. 2005. "The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games." *Immunology* 115 (1) (May): 1-20. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02143.x.
- Heinrich, M, J Neumeyer, M Jakob, C Hallas, V Tchikov, S Winoto-Morbach, M Wickel, et al. 2004. "Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation." *Cell Death and Differentiation* 11 (5) (May): 550-563. doi:10.1038/sj.cdd.4401382.
- Heinrich, M. 1999. "Cathepsin D targeted by acid sphingomyelinase-derived ceramide." *The EMBO Journal* 18 (19): 5252-5263. doi:10.1093/emboj/18.19.5252.
- Hildt, E, and S Oess. 1999. "Identification of Grb2 as a novel binding partner of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1." *The Journal of Experimental Medicine* 189 (11) (June 7): 1707-1714.
- Hirose, E, N Nakashima, T Sekiguchi, and T Nishimoto. 1998. "RagA is a functional homologue of S. cerevisiae Gtr1p involved in the Ran/Gsp1-GTPase pathway." *Journal of Cell Science* 111 (Pt 1) (January): 11-21.
- Hiscott, John, Hakju Kwon, and Pierre Génin. 2001. "Hostile takeovers: viral appropriation of the NF- κ B pathway." *Journal of Clinical Investigation* 107 (2): 143-151. doi:10.1172/JCI11918.
- Hoffmann, Alexander, Andre Levchenko, Martin L Scott, and David Baltimore. 2002. "The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation." *Science (New York, N.Y.)* 298 (5596) (November 8): 1241-1245. doi:10.1126/science.1071914.
- Horton, T M, T S Ranheim, L Aquino, D I Kusher, S K Saha, C F Ware, W S Wold, and L R Gooding. 1991. "Adenovirus E3 14.7K protein functions in the absence of other adenovirus proteins to protect transfected cells from tumor necrosis factor cytolysis." *Journal of Virology* 65 (5) (May): 2629-2639.
- Horwitz, M S. 2001. "Adenovirus immunoregulatory genes and their cellular targets." *Virology* 279 (1) (January 5): 1-8. doi:10.1006/viro.2000.0738.
- Horwitz, Marshall S. 2004. "Function of adenovirus E3 proteins and their interactions with immunoregulatory cell proteins." *The Journal of Gene Medicine* 6 Suppl 1 (February): S172-183. doi:10.1002/jgm.495.
- Hsu, H, J Huang, H B Shu, V Baichwal, and D V Goeddel. 1996. "TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex." *Immunity* 4 (4) (April): 387-396.
- Hsu, H, H B Shu, M G Pan, and D V Goeddel. 1996. "TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways." *Cell* 84 (2) (January 26): 299-308.
- Hsu, H, J Xiong, and D V Goeddel. 1995. "The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation." *Cell* 81 (4) (May 19): 495-504.
- Jacobson, M D, M Weil, and M C Raff. 1997. "Programmed cell death in animal development." *Cell* 88 (3) (February 7): 347-354.
- Journé, Clotilde, Josina Filipe, Frédégonde About, Sébastien A Chevalier, Philippe V Afonso, John N Brady, David Flynn, et al. 2009. "NRP/Optineurin Cooperates with TAX1BP1 to potentiate the activation of NF-kappaB by human T-lymphotropic virus type 1 tax protein." *PLoS Pathogens* 5 (7) (July): e1000521. doi:10.1371/journal.ppat.1000521.
- Karin, M. 1998. "Mitogen-activated protein kinase cascades as regulators of stress responses." *Annals of the New York Academy of Sciences* 851 (June 30): 139-146.
- Kelekar, A, and C B Thompson. 1998. "Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis." *Trends in Cell Biology* 8 (8) (August): 324-330.
- Kelliher, M A, S Grimm, Y Ishida, F Kuo, B Z Stanger, and P Leder. 1998. "The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal." *Immunity* 8 (3) (March): 297-303.
- Kerr, J F, C M Winterford, and B V Harmon. 1994. "Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy." *Cancer* 73 (8) (April 15): 2013-2026.
- Kerr, J F, A H Wyllie, and A R Currie. 1972. "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *British Journal of Cancer* 26 (4) (August): 239-257.
- Keshet, Yonat, and Rony Seger. 2010. "The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 661: 3-38. doi:10.1007/978-1-60761-795-2_1.
- Kim, Hee-Jung, and Mark P Foster. 2002. "Characterization of Ad5 E3-14.7K, an adenoviral inhibitor of apoptosis: structure, oligomeric state, and metal binding." *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 11 (5) (May): 1117-1128.
- Klostergaard, J, with Tang, P, Hung M-C. 1996. "Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer." *Biochemistry* 35 (25) (June 25): 8216-8225. doi:10.1021/bi952182t.
- Knipe, David. 2001. *Fundamental virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Kothakota, S, T Azuma, C Reinhard, A Klippel, J Tang, K Chu, T J McGarry, et al. 1997. "Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis." *Science (New York, N.Y.)* 278 (5336) (October 10): 294-298.
- Krammer, P H. 2000. "CD95's deadly mission in the immune system." *Nature* 407 (6805) (October 12): 789-795. doi:10.1038/35037728.
- Kriegler, M, C Perez, K DeFay, I Albert, and S D Lu. 1988. "A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF." *Cell* 53 (1) (April 8): 45-53.
- Kumar, Ashok, Yasunari Takada, Aladin M Boriek, and Bharat B Aggarwal. 2004. "Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease." *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 82 (7) (July): 434-448. doi:10.1007/s00109-004-0555-y.
- Kumar, S, and J Doumanis. 2000. "The fly caspases." *Cell Death and Differentiation* 7 (11) (November): 1039-1044. doi:10.1038/sj.cdd.4400756.
- Laemmli, U K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227 (5259) (August 15): 680-685.
- Legler, Daniel F, Olivier Micheau, Marie-Agnès Doucey, Jürg Tschopp, and Claude Bron. 2003. "Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNF α -mediated NF-kappaB activation." *Immunity* 18 (5) (May): 655-664.
- Levine, David B. 2008. "The Hospital for the Ruptured and Crippled: William Bradley Coley, third Surgeon-in-Chief 1925-1933." *HSS Journal: The Musculoskeletal Journal of Hospital for Special Surgery* 4 (1) (February): 1-9. doi:10.1007/s11420-007-9063-2.
- Li, H, H Zhu, C J Xu, and J Yuan. 1998. "Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis." *Cell* 94 (4) (August 21): 491-501.
- Li, Hongxiu, Masayuki Kobayashi, Marzenna Blonska, Yun You, and Xin Lin. 2006. "Ubiquitination of RIP is required for tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappaB activation." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (19) (May 12): 13636-13643. doi:10.1074/jbc.M600620200.
- Li, L Y, X Luo, and X Wang. 2001. "Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria." *Nature* 412 (6842) (July 5): 95-99. doi:10.1038/35083620.

- Li, Y., J. Kang, and M. S. Horwitz. 1997. "Interaction of an adenovirus 14.7-kilodalton protein inhibitor of tumor necrosis factor alpha cytolysis with a new member of the GTPase superfamily of signal transducers." *Journal of Virology* 71 (2) (February): 1576-1582.
- . 1998. "Interaction of an adenovirus E3 14.7-kilodalton protein with a novel tumor necrosis factor alpha-inducible cellular protein containing leucine zipper domains." *Molecular and Cellular Biology* 18 (3) (March): 1601-1610.
- Li, Y., J. Kang, J. Friedman, L. Tarassishin, J. Ye, A. Kovalenko, D. Wallach, and M. S. Horwitz. 1999. "Identification of a cell protein (FIP-3) as a modulator of NF- κ B activity and as a target of an adenovirus inhibitor of tumor necrosis factor α -induced apoptosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (3): 1042.
- Liu, X., C. N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson, and X. Wang. 1996. "Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c." *Cell* 86 (1) (July 12): 147-157.
- Liu, Z. G., and J. Han. 2001. "Cellular responses to tumor necrosis factor." *Current Issues in Molecular Biology* 3 (4) (October): 79-90.
- Liu, Z. G., H. Hsu, D. V. Goeddel, and M. Karin. 1996. "Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF- κ B activation prevents cell death." *Cell* 87 (3) (November 1): 565-576.
- Lockshin, Richard A., and Carroll M. Williams. 1964. "Programmed cell death—II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms." *Journal of Insect Physiology* 10 (4) (August): 643-649. doi:10.1016/0022-1910(64)90034-4.
- Locksley, R. M., N. Killeen, and M. J. Lenardo. 2001. "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." *Cell* 104 (4) (February 23): 487-501.
- Luo, X., I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter, and X. Wang. 1998. "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors." *Cell* 94 (4) (August 21): 481-490.
- Madeo, Frank, Eva Herker, Corinna Maldener, Silke Wissing, Stephan Lächelt, Mark Herlan, Markus Fehr, et al. 2002. "A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast." *Molecular Cell* 9 (4) (April): 911-917.
- Mahr, J. A., and L. R. Gooding. 1999. "Immune evasion by adenoviruses." *Immunological Reviews* 168 (April): 121-130.
- Mahr, Jeffrey A., Jeremy M. Boss, and Linda R. Gooding. 2003. "The adenovirus e3 promoter is sensitive to activation signals in human T cells." *Journal of Virology* 77 (2) (January): 1112-1119.
- Majno, G., and I. Joris. 1995. "Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death." *The American Journal of Pathology* 146 (1) (January): 3-15.
- Mankouri, Jamel, Rennos Fragkoudis, Kathryn H. Richards, Laura F. Wetherill, Mark Harris, Alain Kohl, Richard M. Elliott, and Andrew Macdonald. 2010. "Optineurin Negatively Regulates the Induction of IFN β in Response to RNA Virus Infection." Ed. Glenn F. Rall. *PLoS Pathogens* 6 (2): e1000778. doi:10.1371/journal.ppat.1000778.
- Martín-Blanco, E. 2000. "p38 MAPK signalling cascades: ancient roles and new functions." *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 22 (7) (July): 637-645. doi:10.1002/1521-1878(200007)22:7<637::AID-BIES>3.0.CO;2-E.
- Martin, S. J., G. A. O'Brien, W. K. Nishioka, A. J. McGahon, A. Mahboubi, T. C. Saido, and D. R. Green. 1995. "Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis." *The Journal of Biological Chemistry* 270 (12) (March 24): 6425-6428.
- McNees, Adrienne L., and Linda R. Gooding. 2002. "Adenoviral inhibitors of apoptotic cell death." *Virus Research* 88 (1-2) (September): 87-101.
- Mercurio, F., B. W. Murray, A. Shevchenko, B. L. Bennett, D. B. Young, J. W. Li, G. Pascual, et al. 1999. "I κ B kinase (IKK)-associated protein 1, a common component of the heterogeneous IKK complex." *Molecular and Cellular Biology* 19 (2) (February): 1526-1538.
- Micheau, Olivier, and Jürg Tschopp. 2003. "Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes." *Cell* 114 (2) (July 25): 181-190.
- de la Monte, S. M., Y. K. Sohn, N. Ganju, and J. R. Wands. 1998. "P53- and CD95-associated apoptosis in neurodegenerative diseases." *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 78 (4) (April): 401-411.
- Muppidi, J. R., J. Tschopp, and R. M. Siegel. 2004. "Life And Death Decisions: Secondary Complexes and Lipid Rafts in TNF Receptor Family Signal Transduction." *Immunity* 21 (4): 461-465.
- Muzio, M., A. M. Chinnaiyan, F. C. Kischkel, K. O'Rourke, A. Shevchenko, J. Ni, C. Scaffidi, et al. 1996. "FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex." *Cell* 85 (6) (June 14): 817-827.
- Nagabhushana, Ananthamurthy, Megha Bansal, and Ghanshyam Swarup. 2011. "Optineurin Is Required for CYLD-Dependent Inhibition of TNF α -Induced NF- κ B Activation." Ed. Neeraj Vij. *PLoS ONE* 6 (3): e17477. doi:10.1371/journal.pone.0017477.
- Nagabhushana, Ananthamurthy, Madhavi L. Chalasani, Nishant Jain, Vegesna Radha, Nandini Rangaraj, Dorairajan Balasubramanian, and Ghanshyam Swarup. 2010. "Regulation of endocytic trafficking of transferrin receptor by optineurin and its impairment by a glaucoma-associated mutant." *BMC Cell Biology* 11: 4. doi:10.1186/1471-2121-11-4.
- Park, Bum-Chan, Xiang Shen, Mishan Samaraweera, and Beatrice Y. J. T. Yue. 2006. "Studies of optineurin, a glaucoma gene: Golgi fragmentation and cell death from overexpression of wild-type and mutant optineurin in two ocular cell types." *The American Journal of Pathology* 169 (6) (December): 1976-1989.
- Park, Bumchan, Hongyu Ying, Xiang Shen, Jeong-Seok Park, Ye Qiu, Rajalekshmy Shyam, and Beatrice Y. J. T. Yue. 2010. "Impairment of protein trafficking upon overexpression and mutation of optineurin." *PLoS One* 5 (7): e11547. doi:10.1371/journal.pone.0011547.
- Pennica, Diane, Glenn E. Nedwin, Joel S. Hayflick, Peter H. Seeburg, Rik Derynck, Michael A. Palladino, William J. Kohr, Bharat B. Aggarwal, and David V. Goeddel. 1984. "Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin." *Nature* 312 (5996): 724-729. doi:10.1038/312724a0.
- Perkins, N. D. 2000. "The Rel/NF- κ B family: friend and foe." *Trends in Biochemical Sciences* 25 (9) (September): 434-440.
- . 2006. "Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway." *Oncogene* 25 (51) (October 30): 6717-6730. doi:10.1038/sj.onc.1209937.
- Pobezinskaya, Yelena L., You-Sun Kim, Swati Choksi, Michael J. Morgan, Tao Li, Chengyu Liu, and Zhenggang Liu. 2008. "The function of TRADD in signaling via tumor necrosis factor receptor 1 and TRIF-dependent Toll-like receptors." *Nature immunology* 9 (9) (September): 1047-1054. doi:10.1038/ni.1639.
- Rana, Tariq M. 2007. "Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (1): 23-36. doi:10.1038/nrm2085.
- Ranheim, T. S., J. Shisler, T. M. Horton, L. J. Wold, L. R. Gooding, and W. S. Wold. 1993. "Characterization of mutants within the gene for the adenovirus E3 14.7-kilodalton protein which prevents cytolysis by tumor necrosis factor." *Journal of virology* 67 (4): 2159.
- Reed, J. C. 1998. "Bcl-2 family proteins." *Oncogene* 17 (25) (December 24): 3225-3236. doi:10.1038/sj.onc.1202591.
- Reinhard, C. 1997. "Tumor necrosis factor alpha -induced activation of c-jun N-terminal kinase is mediated by TRAF2." *The EMBO Journal* 16 (5): 1080-1092. doi:10.1093/emboj/16.5.1080.
- Rezaie, Tayebbeh, Anne Child, Roger Hitchings, Glen Brice, Lauri Miller, Miguel Coca-Prados, Elise Héon, et al. 2002. "Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin." *Science (New York, N.Y.)* 295 (5557) (February 8): 1077-1079. doi:10.1126/science.1066901.
- Rodman, J. S., M. A. Levy, S. Diment, and P. D. Stahl. 1990. "Immunolocalization of endosomal cathepsin D in rabbit alveolar macrophages." *Journal of Leukocyte Biology* 48 (2) (August): 116-122.
- Rothwarf, D. M., E. Zandi, G. Natoli, and M. Karin. 1998. "IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the I κ B kinase complex." *Nature* 395 (6699) (September 17): 297-300. doi:10.1038/26261.
- Rudel, T. 1997. "Membrane and Morphological Changes in Apoptotic Cells Regulated by Caspase-Mediated Activation of PAK2." *Science* 276 (5318): 1571-1574. doi:10.1126/science.276.5318.1571.
- Sahlender, Daniela A., Rhys C. Roberts, Susan D. Arden, Giulietta Spudich, Marcus J. Taylor, J. Paul Luzio, John Kendrick-Jones, and Folma Buss. 2005. "Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis." *The Journal of Cell Biology* 169 (2) (April 25): 285-295. doi:10.1083/jcb.200501162.
- Salvesen, Guy S., and Colin S. Duckett. 2002. "Apoptosis: IAP proteins: blocking the road to death's door." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3 (6): 401-410. doi:10.1038/nrm830.
- SAMBROOK, J., and D. W. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3 Vol. 0003. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory: 2000.
- Sarfarazi, M., A. Child, D. Stoilova, G. Brice, T. Desai, O. C. Trifan, D. Poinosawmy, and R. P. Crick. 1998. "Localization of the fourth locus (GLC1E) for adult-onset primary open-angle glaucoma to the 10p15-p14 region." *American Journal of Human Genetics* 62 (3) (March): 641-652. doi:10.1086/301767.
- Scaffidi, C., S. Kirchhoff, P. H. Krammer, and M. E. Peter. 1999. "Apoptosis signaling in lymphocytes." *Current Opinion in Immunology* 11 (3) (June): 277-285.
- Schütze, S., T. Machleidt, D. Adam, R. Schwandner, K. Wiegmann, M. L. Kruse, M. Heinrich, M. Wickel, and M. Krönke. 1999. "Inhibition of receptor internalization by monodansylcadaverine selectively blocks p55 tumor necrosis factor receptor death domain signaling." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (15) (April 9): 10203-10212.
- Schneider-Brachert, W., V. Tchikov, J. Neumeyer, M. Jakob, S. Winoto-Morbach, J. Held-Feindt, M. Heinrich, O. Merkel, M. Ehrenschwender, and D. Adam, others. 2004. "Compartmentalization of TNF Receptor 1 Signaling: Internalized TNF Receptosomes as Death Signaling Vesicles." *Immunity* 21 (3): 415-428.
- Schneider-Brachert, Wulf, Vladimir Tchikov, Oliver Merkel, Marten Jakob, Cora Hallas, Marie-Luise Kruse, Peter Grottel, et al. 2006. "Inhibition of TNF receptor 1 internalization by adenovirus 14.7K as a novel immune escape mechanism." *The Journal of Clinical Investigation* 116 (11) (November): 2901-2913. doi:10.1172/JCI23771.
- Schreiber, M., L. Sedger, and G. McFadden. 1997. "Distinct domains of M-T2, the myxoma virus tumor necrosis factor (TNF) receptor homolog, mediate extracellular TNF binding and intracellular apoptosis inhibition." *Journal of virology* 71 (3): 2171.
- Schwaborn, K., R. Weil, G. Courtois, S. T. Whiteside, and A. Israël. 2000. "Phorbol esters and cytokines regulate the expression of the NEMO-related protein, a molecule involved in a NF- κ B-independent pathway." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (30) (July 28): 22780-22789. doi:10.1074/jbc.M001500200.
- Shembade, Noura, Nicole S. Harhaj, Kislay Parvatiyar, Neal G. Copeland, Nancy A. Jenkins, Lydia E. Matesic, and Edward W. Harhaj. 2008. "The E3 ligase Itch negatively regulates inflammatory signaling pathways by controlling the function of the ubiquitin-editing enzyme A20." *Nature Immunology* 9 (3): 254-262. doi:10.1038/ni1563.
- Shi, Yigong. 2002. "Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis." *Molecular Cell* 9 (3) (March): 459-470.
- Smale, G., N. R. Nichols, D. R. Brady, C. E. Finch, and W. E. Horton. 1995. "Evidence for apoptotic cell death in Alzheimer's disease." *Experimental Neurology* 133 (2) (June): 225-230. doi:10.1006/exnr.1995.1025.
- Smith, C. 1994. "The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: Activation, costimulation, and death." *Cell* 76 (6): 959-962. doi:10.1016/0092-8674(94)90372-7.

- Stewart, B W. 1994. "Mechanisms of apoptosis: integration of genetic, biochemical, and cellular indicators." *Journal of the National Cancer Institute* 86 (17) (September 7): 1286-1296.
- Swarup, Ghanshyam, and Ananthamurthy Nagabhushana. 2010. "Optineurin, a multifunctional protein involved in glaucoma, amyotrophic lateral sclerosis and antiviral signalling." *Journal of Biosciences* 35 (4) (December): 501-505.
- Tartaglia, Louis A., T.Merrill Ayres, Grace H.W. Wong, and David V. Goeddel. 1993. "A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death." *Cell* 74 (5): 845-853. doi:10.1016/0092-8674(93)90464-2.
- Tatton, N A, A Maclean-Fraser, W G Tatton, D P Perl, and C W Olanow. 1998. "A fluorescent double-labeling method to detect and confirm apoptotic nuclei in Parkinson's disease." *Annals of Neurology* 44 (3 Suppl 1) (September): S142-148.
- Taylor, P C, A M Peters, E Paleolog, P T Chapman, M J Elliott, R McCloskey, M Feldmann, and R N Maini. 2000. "Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis." *Arthritis and Rheumatism* 43 (1) (January): 38-47. doi:10.1002/1529-0131(200001)43:1<38::AID-ANR6>3.0.CO;2-L.
- Tchikov, Vladimir, and Stefan Schütze. 2008. "Immunomagnetic isolation of tumor necrosis factor receptors." *Methods in Enzymology* 442: 101-123. doi:10.1016/S0076-6879(08)01405-5.
- Thome, M, and J Tschopp. 2001. "Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP." *Nature Reviews. Immunology* 1 (1) (October): 50-58. doi:10.1038/35095508.
- Thornberry, N. A. 1997. "The caspase family of cysteine proteases." *British medical bulletin* 53 (3): 478.
- Ting, A T, F X Pimentel-Muñoz, and B Seed. 1996. "RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF-kappaB but not Fas/APO-1-initiated apoptosis." *The EMBO Journal* 15 (22) (November 15): 6189-6196.
- Tollefson, A E, T W Hermiston, D L Lichtenstein, C F Colle, R A Tripp, T Dimitrov, K Toth, C E Wells, P C Doherty, and W S Wold. 1998. "Forced degradation of Fas inhibits apoptosis in adenovirus-infected cells." *Nature* 392 (6677) (April 16): 726-730. doi:10.1038/33712.
- Tollefson, A E, K Toth, K Doronin, M Kuppawamy, O A Doronina, D L Lichtenstein, T W Hermiston, C A Smith, and W S Wold. 2001. "Inhibition of TRAIL-induced apoptosis and forced internalization of TRAIL receptor 1 by adenovirus proteins." *Journal of Virology* 75 (19) (October): 8875-8887. doi:10.1128/JVI.75.19.8875-8887.2001.
- Tortorella, D, B E Gewurz, M H Furman, D J Schust, and H L Ploegh. 2000. "Viral subversion of the immune system." *Annual Review of Immunology* 18: 861-926. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.861.
- Upton, C, J L Macen, M Schreiber, and G McFadden. 1991. "Myxoma virus expresses a secreted protein with homology to the tumor necrosis factor receptor gene family that contributes to viral virulence." *Virology* 184 (1) (September): 370-382.
- Vanden Berghe, W, S Plaisance, E Boone, K De Bosscher, M L Schmitz, W Fiers, and G Haegeman. 1998. "p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (6) (February 6): 3285-3290.
- Vaux, D L, G Haeccker, and A Strasser. 1994. "An evolutionary perspective on apoptosis." *Cell* 76 (5) (March 11): 777-779.
- Vaux, D L, and J Silke. 2005. "IAPs—the ubiquitin connection." *Cell Death and Differentiation* 12 (9) (September): 1205-1207. doi:10.1038/sj.cdd.4401696.
- Verma, I M, J K Stevenson, E M Schwarz, D Van Antwerp, and S Miyamoto. 1995. "Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation." *Genes & Development* 9 (22) (November 15): 2723-2735.
- Wajant, H., K. Pfizenmaier, and P. Scheurich. 2003. "Tumor necrosis factor signaling." *Cell Death & Differentiation* 10 (1): 45-65.
- Wang, X. 2001. "The expanding role of mitochondria in apoptosis." *Genes & Development* 15 (22): 2922.
- Wertz, Ingrid E., Karen M. O'Rourke, Honglin Zhou, Michael Eby, L. Aravind, Somasekar Seshagiri, Ping Wu, et al. 2004. "De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kB signalling." *Nature* 430 (7000): 694-699. doi:10.1038/nature02794.
- Wiegmann, K, S Schütze, T Machleidt, D Witte, and M Krönke. 1994. "Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling." *Cell* 78 (6) (September 23): 1005-1015.
- Wu, Chuan-Jin, Dietrich B Conze, Tao Li, Srinivasa M Srinivasula, and Jonathan D Ashwell. 2006a. "Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF-kappaB activation [corrected]." *Nature Cell Biology* 8 (4) (April): 398-406. doi:10.1038/ncb1384.
- Wu, Chuan-Jin, Dietrich B. Conze, Tao Li, Srinivasa M. Srinivasula, and Jonathan D. Ashwell. 2006b. "NEMO is a sensor of Lys 63-linked polyubiquitination and functions in NF-kB activation." *Nature Cell Biology* 8 (4): 398-406. doi:10.1038/ncb1384.
- Wyllie, A H, J F Kerr, and A R Currie. 1980. "Cell death: the significance of apoptosis." *International Review of Cytology* 68: 251-306.
- Yamaoka, S, G Courtis, C Bessia, S T Whiteside, R Weil, F Agou, H E Kirk, R J Kay, and A Israël. 1998. "Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation." *Cell* 93 (7) (June 26): 1231-1240.
- Yang, Jin Kuk, Liwei Wang, Lixin Zheng, Fengyi Wan, Misonara Ahmed, Michael J. Lenardo, and Hao Wu. 2005. "Crystal Structure of MC159 Reveals Molecular Mechanism of DISC Assembly and FLIP Inhibition." *Molecular Cell* 20 (6): 939-949. doi:10.1016/j.molcel.2005.10.023.
- Yeh, W C, A Shahinian, D Speiser, J Kraunus, F Billia, A Wakeham, J L de la Pompa, et al. 1997. "Early lethality, functional NF-kappaB activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice." *Immunity* 7 (5) (November): 715-725.
- Ying, Hongyu, Xiang Shen, Bumchan Park, and Beatrice Y J T Yue. 2010. "Posttranslational modifications, localization, and protein interactions of optineurin, the product of a glaucoma gene." *PloS One* 5 (2): e9168. doi:10.1371/journal.pone.0009168.
- Yuan, J, S Shaham, S Ledoux, H M Ellis, and H R Horvitz. 1993. "The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme." *Cell* 75 (4) (November 19): 641-652.
- Yuan, L, and A H Neufeld. 2000. "Tumor necrosis factor-alpha: a potentially neurodestructive cytokine produced by glia in the human glaucomatous optic nerve head." *Glia* 32 (1) (October): 42-50.
- Zamore, P D, T Tuschl, P A Sharp, and D P Bartel. 2000. "RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals." *Cell* 101 (1) (March 31): 25-33. doi:10.1016/S0092-8674(00)80620-0.
- Zamzami, N, and G Kroemer. 2001. "The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2 (1) (January): 67-71. doi:10.1038/35048073.
- Zhang, S Q, A Kovalenko, G Cantarella, and D Wallach. 2000. "Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKKgamma) upon receptor stimulation." *Immunity* 12 (3) (March): 301-311.
- Zhu, Guozhi, Chuan-Jin Wu, Yongge Zhao, and Jonathan D Ashwell. 2007. "Optineurin negatively regulates TNFalpha-induced NF-kappaB activation by competing with NEMO for ubiquitinated RIP." *Current Biology: CB* 17 (16) (August 21): 1438-1443. doi:10.1016/j.cub.2007.07.041.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich **PD. Dr. Wulf Schneider** sehr herzlich für die Zurverfügungstellung des hochinteressanten Themas und für die Bereitschaft zur Betreuung meiner Arbeit danken. Die Möglichkeit, eigenen Forschungsideen uneingeschränkt nachgehen zu können und diese frei diskutieren zu dürfen, habe ich stets als Privileg empfunden. Auch für seine stets optimistische Haltung und viele fachübergreifende Gespräche möchte ich mich bedanken.

Ebenso herzlich möchte ich mich bei **Prof. Dr. Thomas Langmann** dafür bedanken, dass er sich freundlicherweise bereit erklärt hat, meine Arbeit an der NWF III zu vertreten und das Erstgutachten zu übernehmen.

Besonders möchte ich mich außerdem bei **Benedikt Asbach** für Ideen, biochemische Ratschläge und Verbesserungsvorschläge und Tipps zur Arbeit bedanken.

Außerdem danke ich allen aktuellen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen für ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima. Speziell bedanke ich mich dabei bei meinen Kollegen der AG Schneider, Maria Kurz, Getrud Knoll, Elke Perthen, Matthias Hölzl und Janina Podolsky. Besonderer Dank gilt dabei **Ulrike Heigl**, mit der ich alle Höhen und Tiefen der Doktorarbeit teilen konnte.

Danken möchte ich auch Thomas Loenhardt und Thorsten Gnad, die mich beide moralisch und sportlich auf meinem Weg unterstützt haben. Für den musikalischen Ausgleich zum Laboralltag danke ich meinen ehemaligen Band-Kollegen und Reinald Speck.

Schließlich möchte ich mich sehr herzlich bei meinen **Eltern**, meiner Schwester **Anna** und meinem lieben **Tim** bedanken, die mich zu jeder Zeit unterstützt haben und mit Rat und Tat zur Seite standen.